

Aus der Klinik für Gastroenterologie und gastrointestinale Onkologie
(Prof. Dr. med. V. Ellenrieder)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der direkte und indirekte Effekt von Zytokinen bei Morbus-Crohn-Patienten auf die Differenzierung von Osteoklasten

- Effekt unter besonderer Berücksichtigung von $TNF-\alpha$, Interleukin- 1β und
Interleukin-6 -

INAUGURAL-DISSERTATION

zu der Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Enver Aydilek

aus

Sulingen

Göttingen 2019

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referentin	Prof. Dr. med. H. Siggelkow
Ko-Referent:	Prof. Dr. med. N. Miosge
Drittreferentin:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 28.10.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der direkte und indirekte Effekt von Zytokinen bei Morbus-Crohn-Patienten auf die Differenzierung von Osteoklasten - Effekt unter besonderer Berücksichtigung von TNF- α , Interleukin-1 β und Interleukin-6 - eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 02.10.2019

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Knochen: Zusammensetzung, Funktion und Stoffwechsel	1
1.1.1	Die Knochenzellen: Der Osteoblast	2
1.1.2	Der Osteozyt	3
1.1.3	Der Osteoklast	3
1.1.4	Resorptionszyklus (Remodeling)	5
1.2	Osteoklastendifferenzierung: Historische Entwicklung	8
1.2.1	RANK/RANKL/OPG- Systems	9
1.2.2	Histochemische Osteoklastenmarker	10
1.2.3	Zytokine bei der Osteoklastendifferenzierung	11
1.3	Morbus Crohn: Definition	12
1.3.1	Epidemiologie in zeitlicher Dynamik	12
1.3.2	Altersgipfel und Geschlechterverteilung	13
1.3.3	Umweltfaktoren	13
1.3.4	Ethnisch soziökonomischer Unterschied	13
1.3.5	Krankheitsbild	13
1.3.6	Pathogenese und Ätiologie	14
1.3.7	Risikofaktoren und klinische Folgen	15
1.4	Therapiemöglichkeiten und neue Ansätze bei Morbus-Crohn-bedingter Osteoporose	16
1.5	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Verwendete Geräte und Materialien	18
2.1.2	Verwendete Reagenzien	19
2.1.3	Materialien für die RT-PCR	19
2.1.4	Toluidinblau-Färbungen	20
2.1.5	TRAP-Färbung	20
2.1.6	24-Well-Färbung	21
2.1.7	Realtime-PCR-Primer	21
2.1.8	Immunfärbung	22
2.1.9	Proteinvorbereitung	22
2.1.10	Lysepuffer	22
2.1.11	Western Blot	23
2.1.12	TBS-T	23
2.1.13	Image-J-Densitometrie	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Monozytenisolation	24
2.2.2	Kultivierung und Zellanzucht	26
2.2.3	Medium-Wechsel	26
2.2.4	Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum von Morbus-Crohn-Patienten	26
2.2.5	Stimulierung von Zellen mit Zytokinen	27
2.2.6	Überstandgewinnung und inkubierte Zytokine	27
2.2.7	Zellzahlbestimmung	27
2.2.8	Ablösen der Zellen	28
2.2.9	RNA-Isolierung	28
2.2.10	Photometrische Konzentrationsbestimmung des RNA-Gehaltes	29
2.2.11	cDNA-Synthese	29
2.2.12	Realtime-PCR	30
2.2.13	Statistische Auswertung	32
2.2.14	Toluidinblau-Färbung	33
2.2.15	TRAP-Färbung	33

2.2.16	Resorptionsassay-Kit 24.....	34
2.2.17	Osteoklastenaktivitätsmessung mit 24er-Wellplatte	35
2.2.18	Immunfärbung	36
2.2.19	Western Blot.....	36
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Monozytenisolation und Osteogene Differenzierung.....	38
3.1.1	Osteoklastendifferenzierung	38
3.1.2	Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen.....	40
3.1.3	Zytokineffekt auf die Differenzierung von Osteoklasten	43
3.1.4	Genexpression von RANKL und OPG in Osteoblasten.....	44
3.1.5	Effekt der Überstände auf die Differenzierung von Osteoklasten.....	45
3.1.6	Vergleich der Genexpression von Überständen vs. inkubierten Zytokinen.....	46
3.2	TRAP-Färbung	47
3.3	Mikroskopische Fluoreszenzbestimmung von VNRT auf Osteoklasten.....	48
3.4	Resorptionsanalyse.....	49
3.4.1	Bestimmung der Resorption auf Dentinscheiben	49
3.4.2	Resorptionsassay-Kit 24.....	50
3.4.3	24-Well-Resorptionsplatte	52
3.5	Western Blot	56
3.6	Etablierung des Systems	57
4	Diskussion.....	60
4.1	Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen.....	61
4.2	Zytokinkombination führt zu der erniedrigten Expression von Oberflächenproteinen	62
4.3	Indirekte Wirkung von Zytokinen	63
4.4	Resorptionsanalyse.....	65
4.5	Osteoklastendifferenzierung und -aktivität am höchsten an Tag 9	67
4.6	Osteoklastendifferenzierung und Genexpression am höchsten an Tag 9.....	67
4.7	Western Blot: Aussagekraft.....	68
4.8	Rückblickender Vergleich der Versuche 1-4 und der Etablierungsversuche....	69
5	Ausblick.....	70
6	Zusammenfassung	71
7	Tabellenverzeichnis	73
8	Abbildungsverzeichnis	74
9	Abkürzungsverzeichnis	76
10	Literaturverzeichnis.....	78

1 Einleitung

1.1 Der Knochen: Zusammensetzung, Funktion und Stoffwechsel

Mit seiner Eigenschaft als Stützgerüst des Körpers und Teil des Bewegungsapparates ist der Knochen ein unersetzlicher Bestandteil des Menschen. Neben einer mechanisch-funktionellen Bedeutung, die einem Leichtbauprinzip mit einer funktionellen Elastizität unterliegt (Turner 2006), beinhaltet der Knochen ein immenses Speicherreservoir für den Calcium -und Phosphathaushalt und ist mit seinem Knochenmark als primärer Ort der postnatalen Hämatopoese charakterisiert (Mikkola und Orkin 2005).

Seine Bestandteile setzen sich aus einer interzellulären Substanz und den Knochenzellen zusammen. Erstere umfasst die anorganischen Bestandteile (70%iger Anteil) wie Calcium und Phosphat, zum größten Teil in Form von Apatitkristallen, welche die Härte und die Druckbeständigkeit des Knochens bedingen. Der restliche Anteil besteht aus organischen Bestandteilen (20%iger Anteil) und Hydratationswasser (10%iger Anteil). Diese Zusammensetzung wiederum variiert altersbedingt und tritt im hohen Alter mit einer Zunahme des anorganischen Anteils und somit einem erhöhten Frakturrisiko in den Vordergrund. Als Osteoid wird der organische, nicht mineralisierte Bestandteil der Grundsubstanz bezeichnet. Das Osteoid wird durch Osteoblasten produziert und besteht neben Proteoglykanen, Phosphoproteinen und Glykosaminoglykanen hauptsächlich aus dem Kollagen-Typ I (90-95%), welches dem Knochen die elastische Eigenschaft vermittelt und somit protektiv bei Zugkräften ist. Sobald der Prozess der Osteoidsynthese durch die Osteoblasten abgeschlossen ist, verbleiben die Osteoblasten in einem inaktiven Zustand auf der Knochenoberfläche und gelten somit als sogenannte *bone lining cells*. *Bone lining cells* sind dünn über der Knochenoberfläche verteilt, haben flache oder leicht eiförmige Kerne und eine Verbindung zu anderen *bone lining cells* über *gap junctions* mit denen sie Zellprozesse übermitteln (Miller et al. 1989). Nach einer Stimulation mit Parathormon (PTH) kontrahieren die *bone lining cells* und sezernieren zugleich Enzyme, die Osteoide entflechten, und schaffen den Osteoklasten eine fundierte Voraussetzung für die Knochenresorption (Mikami et al. 1989).

Der Knochen ist im ständigen Fluss eines Auf- und Abbaus (Remodeling) durch die Knochenmatrix synthetisierenden Osteoblasten und den resorbierenden Osteoklasten, deren Aktivität, Differenzierung und Reifung durch verschieden viele Mediatoren (u. a. Hormone, Vitamine, Zytokine, mechanische Belastung) direkt und indirekt reguliert wird (Suda et al. 1995; Nakao et al. 2007). Durch diesen Zusammenhang kommt dem

Knochen als dem größten Kalzium-Reservoir die Aufgabe zu den Kalzium -und Phosphathaushalt zu regulieren.

1.1.1 Die Knochenzellen: Der Osteoblast

Multipotente Stammzellen (MSCs) können sich zu einer Reihe von Zellen differenzieren, wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten (Penny et al. 2012). Die Wahl, als welches Zielgewebe sich eine Vorläuferzelle etabliert, hängt u. a. von den zelltypischen Signalen, Transkriptionsfaktoren und spezifischen Genexpressionen ab. Unter der Wirkung von *bone morphogenetic proteins* (BMPs) und dem Wnt-Signalweg entwickeln sich die MSC zu Osteo-/Chondroprogenitorzellen, wobei zugleich der Differenzierungsweg zu den Adipozyten unterdrückt wird (Bennett et al. 2005; Lin und Hankenson 2011). Transkriptionsfaktoren wie RUNX2, Dlx5 und Osx, welche von den gemeinsamen Osteoblasten/Chondroblasten-Vorläuferzellen sekretiert werden, differenzieren die Zellen zu der alleinigen Osteoblastenlinie, die im weiteren Verlauf von einem Präosteoblasten zum endgültig reifen Osteoblasten werden (Lee et al. 2006; Long 2011). Morphologisch ist der Osteoblast durch einen rundem basalen euchromatiden Nukleus, einen voluminösen Nucleolus, ein basophiles Zytoplasma, gut ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum (rER) und prominenten Golgi-Komplex charakterisiert, welcher ein Ausdruck für eine gesteigerter Proteinbiosynthese ist (Robling et al. 2002).

Die Hauptfunktion eines Osteoblasten ist die Synthese der nicht mineralisierten organischen Knochenmatrix, des sogenannten Osteoids, welches hauptsächlich aus Kollagen-Typ I und den nicht kollagenen Bestandteilen u. a. Proteoglykanen (Decorin, Biglycan), Glykoproteinen (Osteonectin, Osteopontin, Fibronectin), Peptidhormonen (Osteocalcin) sowie Enzymen (ALP, Metalloproteasen) besteht (Warren et al. 2015). Diese Sekretionsbestandteile können in vitro als Osteoblastenmarker benutzt werden, wobei vor allem die alkalische Phosphatase (ALP) und der PTH1-Rezeptor global oder ubiquitär auf allen Osteoblasten exprimiert werden und somit für die Identifikation bzw. Aktivität der Osteoblasten herangezogen werden können (Wong und Cohn 1974; Candelieri et al. 2001). Das durch Vitamin K modifizierte kleine Protein Osteocalcin dient mit seiner zweifach negativen Struktur als Anlagerungsplatz für das Calciumion. Das somit lokal konzentrierte Calciumion kann mit Hilfe des *bone sialoproteins* (BSP) den Kristallisationskeim für das Hydroxylapatit bereitstellen. Eine weitere und wichtige Aufgabe des Osteoblasten ist die aktive Aufnahme von Calcium und Phosphat und die anschließende lokale Übersättigung durch gezielte Sezernierung. Somit wird durch das Ausfallen von Calcium und Phosphat die Mineralisierung der Grundsubstanz gewährleistet (Wade-Gueye et al. 2012).

1.1.2 Der Osteozyt

Innerhalb der Knochenmatrix sind die Osteozyten lokalisiert, welche aus mesenchymalen Stammzellen während der Osteoblastendifferenzierung abstammen. Die matrixproduzierenden Osteoblasten können entweder in die Apoptose eingehen, *bone lining cells* werden, oder zu 10-20% als Osteozyt in die Knochenmatrix eingebettet werden (Manolagas 2000; Rochefort et al. 2010). Auch nach Ihrer Einbettung bleiben die Osteozyten aktiv im Knochenumbauprozess, indem sie Verbindungen an der Knochenoberfläche zu Osteoblasten und Osteoklasten sowie zu anderen Osteozyten durch ein umfangreiches kanalikuläres Netzwerk aufrechterhalten. Sie sind in der Lage auf mechanische Reize verschiedene Mediatoren auszuschütten, die sowohl die Knochenbildung aktivieren (NO, ATP, PGE₂) als auch hemmen (Sclerostin) (Neve et al. 2012). Zusätzlich sind die Osteozyten in der Lage den löslichen 'Receptor Activator of NF- κ B' Liganden RANKL freizusetzen, welcher u. a. die Osteoklastendifferenzierung vermittelt (van Bezooijen et al. 2004; Nakashima et al. 2011) sowie andere Proteine (DMP-1, MEPE, PHEX), die den Phosphathaushalt regulieren können (Neve et al. 2012).

1.1.3 Der Osteoklast

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die sich unter der Anwesenheit von Makrophagen-Kolonie stimulierendem Faktor M-CSF und dem *receptor-activator-of NF- κ B Ligand* RANKL aus hämatopoetischen Stammzellen differenzieren (Hofbauer 2006). Die Osteoklasten, Makrophagen und dendritischen Zellen entstammen einem gemeinsamen Ursprung, den promyeloiden Vorläuferzellen. Entscheidend für den weiteren Verlauf der Differenzierung zu einem Osteoklasten ist das M-CSF (Väänänen et al. 2000). Das von den Stromazellen gebildete M-CSF bindet an den c-FMS-Rezeptor, welcher auf monozytären Vorläuferzellen exprimiert wird. Durch diese Interaktion kommt es zu einer Proliferation der Zelle sowie einer anti-apoptotischen Wirkung (Neumann et al. 2014). Die nun proliferierenden Zellen werden zu Osteoklasten unter der Wirkung von RANKL differenziert. Der zu der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie gehörende RANK-Ligand wird hauptsächlich von Präosteoblasten, Osteozyten und mesenchymalen Vorläuferzellen gebildet. Ihr Plasmamembranrezeptor RANK wird u. a. auf den Monozyten exprimiert (Neumann und Schett 2007).

Morphologisch ist der Osteoklast durch zahlreiche Mitochondrien, stark ausgeprägten rER und rund um den Kern gut entwickelten Golgi-Apparat charakterisiert. Osteoklasten beinhalten außerdem noch viele Vesikel, Vakuolen und rohrförmige Lysosomen. Somit wird eine hohe Proteinbiosynthese und Energielieferung gewährleistet. Ist der Osteoklast

in der Resorptionsphase aktiviert, so zeigt sich eine Zellpolarität. Die Plasmamembran ist gegliedert in drei Zonen: *clear zone/sealing zone*, basolaterale Membran und *ruffled border*. Die *clear* oder *sealing zone* besteht aus vielen ringförmigen Fokalkontakten, deren Zytoplasma viel Actin beinhaltet (Actin-Ring). Ihre Funktion ist die Anheftung der Osteoklasten an die Knochenmatrix und die Bildung eines isolierten Milieus gegen den Extrazellularraum (Nakamura 2007). Diese Befestigung wird durch den Vitronektin-Rezeptor vermittelt, der somit auch ein Marker für die Osteoklasten darstellt (Chambers und Fuller 2011). Die gefaltete Plasmamembran, welche zu der Knochenmatrix zugewandt ist, wird als *ruffled border* bezeichnet und ist ein herausragendes Merkmal der Osteoklasten. In diesem Bereich wird die Knochenresorption durch die Osteoklasten mittels Auflösung von Hydroxylapatit und dem organischen Zellmaterial gewährleistet. Dafür sezerniert die Carboanhydrase Protonen, welche durch ATPasen angetriebene Vakuolen in die Howship Lacunen transportiert werden. Neben Protonen, die für ein saures Milieu sorgen, werden auch Chloridionen durch Kanäle hineintransportiert (Baumgart und Sandborn 2012). Die organischen Komponenten der Knochenmatrix werden durch Cathepsin K und MMP9 abgebaut, weshalb man diese auch für die Bestimmung der Osteoklasten als Marker betrachten kann (Khor et al. 2011). Die basolaterale Membran ist zuständig für den Empfang von Signalen, vor allem von Calcitonin sowie Zytokinen und darüber hinaus der Zell-Zell-Interaktion mit Osteoblasten (Nakamura 2000).

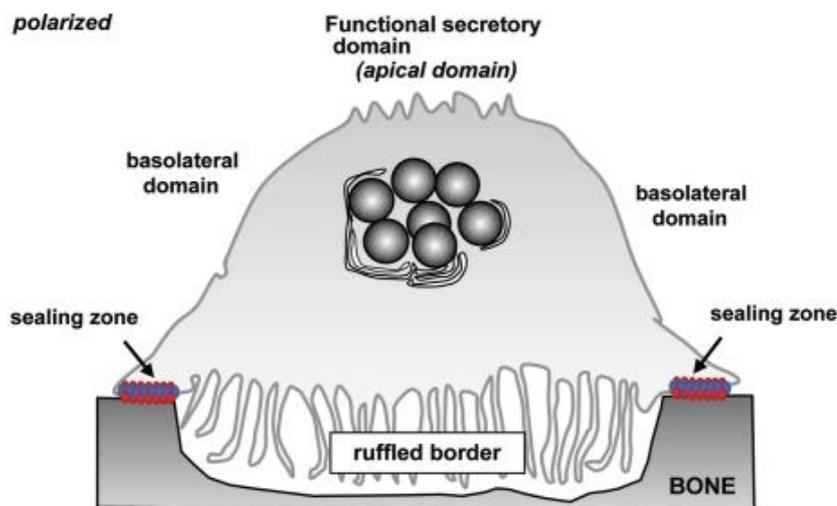


Abbildung 1:

Membrandomäne während der Osteoklastenaktivierung mit basolateraler Domäne, der *sealing zone* und dem *ruffled border* (Itzstein et al. 2011). „CC BY-NC 3.0.“

1.1.4 Resorptionszyklus (Remodeling)

Der Knochen unterliegt einem lebenslangen Umbauprozess, der durch mechanische Kräfte und physiologische Einflüsse angetrieben wird. Der Knochenumbau ist der Prozess, durch den die Knochen erneuert werden, um die Knochenfestigkeit und Mineralhomöostase aufrechtzuerhalten. Der Umbau beinhaltet die kontinuierliche Entfernung von altem Knochen und den Austausch mit neu synthetisierten und anschließend mineralisierten Knochengewebe (Clarke 2008). Neben einem funktionsfähigen Knochenaufbau ist auch die Knochenresorption essentiell u. a. für Knochenwachstum und Frakturheilung, aber auch für den Zahndurchbruch und den Calcium- und Phosphatspiegel. Der kontinuierliche Umbau von Knochen macht einen intakten und aufeinander abgestimmten Resorptionszyklus unausweichlich. Bei mehreren Krankheiten (entzündliche Darmerkrankungen, maligne Hyperkalzämie, postmenopausale Osteoporose) ist die Knochenresorption der entscheidende pathophysiologische Mechanismus (Väänänen et al. 2000).

Der Knochenumbauprozess dauert einige Wochen und wird von einer Gruppe von Zellen ausgeführt, wie Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten, die auch unter dem Namen multizelluläre Grundeinheit (BMU = *basic multicellular units*) zusammengefasst werden. Innerhalb dieser multizellulären Grundeinheit sind die Zellen räumlich und zeitlich perfekt aufeinander abgestimmt und angeordnet. Der Umbauprozess kann zeitlich wie folgt gegliedert werden: Aktivierung, Resorption, Umkehrung, Neubildung, Beendigung.

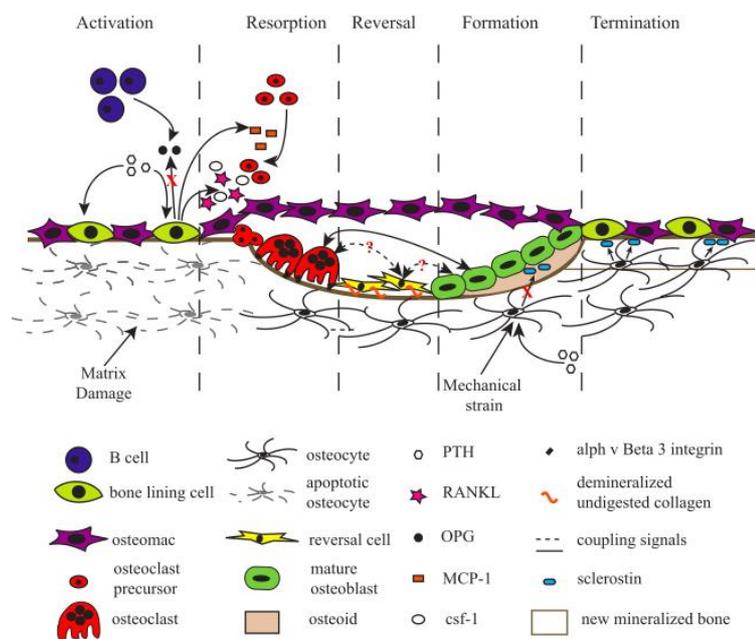


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer multizellulären Grundeinheit und dem dazugehörigen Knochenumbauprozess (Raggatt und Partridge 2010). „Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des ASBMB.“

Die Knochenoberfläche ist im Ruhezustand mit *bone lining cells* bedeckt, die u. a. Präosteoblasten enthalten. Außerdem finden sich mehrere Osteomacs, welche sind Gewebemakrophagen sind die unmittelbar durch die Nähe der Knochenoberfläche identifiziert werden und u. a. für die für Aufrechterhaltung von reifen Osteoblasten notwendig sind. Die B-Zellen des Knochenmarks produzieren gleichzeitig OPG, welche zuerst die Osteoklastogenese hemmen. Erst nach einem externen Signal, welcher entweder durch einen strukturellen Schaden oder hormonell bedingt sein kann (PTH, Östrogen), beginnt der Resorptionszyklus mit der Aktivierung. In diesem Übermittlungsprozess sind vor allem auch die Osteozyten mitverantwortlich, deren Funktion die Übersetzung eines mechanischen Signals in ein biologisches Signal ist und somit zu der Auslösung des Resorptionszyklus angenommen wird (Augat et al. 2005). Die Aktivierung wird entweder durch ein mechanisches oder hormonell bedingtes Signal eingeleitet. Bei dem hormonellen Weg bindet das aus den Nebenschilddrüsen sekretierte PTH an seinen Rezeptor auf der Oberfläche der Präosteoblasten und rekrutiert durch ein G-Protein den Signalweg der Präosteoklasten und induziert sogleich die Osteoklastenaktivierung und -differenzierung.

Im zweiten Weg wird durch einen externen Schaden an der Knochenmatrix die Apoptose der Osteozyten eingeleitet. In Ruhebedingungen scheidet der Osteozyt das Zytokin TGF- β aus, welches die Osteoklastogenese verhindert (Heino et al. 2002). Durch die Einleitung der Apoptose der Osteozyten wird nun der TGF- β Spiegel gesenkt und der hemmende Mechanismus geschwächt. Somit werden optimale Voraussetzungen für die Osteoklastogenese geschaffen.

Nachdem die Zellen aktiviert und die Osteoklasten an die Resorptionszone rekrutiert wurden, werden von den Osteoblasten weitere Faktoren durch die Wirkung des PTHs gebildet. Dazu zählt das MCP-1, RANKL, CSF-1, OPG, MMP9/13. Das MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) dient als chemischer Lockstoff für die Osteoklastenvorläuferzellen und erhöht die RANKL induzierte Osteoklastogenese (Li et al. 2007). Ein besonderes Augenmerk sind hier auf das RANKL, CSF-1 und OPG als Masterprotein für die Osteoklastogenese zu legen. Die Bildung von OPG durch den Osteoblasten wird reduziert, wobei die Expression von RANKL und CSF-1 ansteigt. Das CSF-1 fördert das Überleben und die Proliferation der Osteoklastenvorläuferzellen (Insogna et al. 1997). Das RANKL übernimmt die gleichen Aufgaben, jedoch zusätzlich noch die Differenzierung zu multinuklearen Osteoklasten sowie die Resorptionsaktivität und verlängerte Lebensdauer der reifen Zellen (Burgess et al. 1999).

Für die Bildung einer isolierten Mikroumgebung, die für die Resorption benötigt wird, werden die Matrixmetalloproteasen 9 und 13 von den Osteoblasten sezerniert. Diese bewirken eine Degradierung des Osteoids, indem sie die nicht mineralisierten Bestandteile des Knochens abbauen und dadurch die Osteoklastenbindungsstellen (Arginin (R) Glycin (G) Asparaginsäure (D)) freilegen. Diese Osteoklastenbindungsstellen bestehen aus der Aminosäuresequenz Arginin, Glycin, Asparaginsäure, die in dem osteoklastenspezifischen Oberflächenprotein Vitronectin enthalten sind und eine Bindungsmöglichkeit für die membrangebundene Integrine (Integrin alpha-V) darstellen (Schvartz et al. 1999). Durch dieses Molekül kommt es nun zu einer Adhäsion an den RGD's und somit der Bildung einer isolierten Mikroumgebung, die als *sealing zone* bezeichnet wird (McHugh et al. 2000).

Im letzten Schritt der Resorptionsphase werden Wasserstoffionen in die isolierte Mikroumgebung gepumpt. Der pH-Wert wird somit erniedrigt und die Degradierung der mineralisierten Knochenmatrix dadurch eingeleitet. Der restliche Anteil der mineralisierten Knochenmatrix wird durch kollagenolytische Enzyme, wie u. a. das Cathepsin K, abgebaut.

In dieser Phase werden letzte Rückstände in Form von unverdauter und demineralisierter Kollagenmatrix in Howship-Lakunen durch spezielle mononukleare Zellen abgebaut und die Resorption wird durch die Osteoklasten beendet. Aufgrund ihrer Expression von alkalischer Phosphatase und das Fehlen von MOMA-2 (*monocyte and macrophage antibody-2*) wurden diese Zellen mittlerweile jedoch zu der Osteoblastenzellreihe zugeordnet (Everts et al. 2002).

Die Signale und Moleküle für die Bildung von neuer Knochenmatrix entstammen aus der abgebauten Knochenmatrix, den Osteoklasten und vermutlich auch aus den speziellen mononuklearen Zellen, die für den Umkehrprozess verantwortlich sind. Zu den von Osteoklasten sezernierten Molekülen zählt Sphingosin-1-Phosphat, welches die Osteoblastenvorläuferzellen rekrutiert und eine verlängerte Überlebenszeit der reifen Osteoblasten vermittelt. Des Weiteren wird von den Osteoklasten der Ligand ephrin-B2 abgegeben, dessen Rezeptor auf Osteoblasten exprimiert wird. Die Interaktion des Liganden ephrin-B2 mit seinem Rezeptor führt zu einer verbesserten osteogenen Differenzierung zu Osteoblasten und sogleich zu einer Unterdrückung der Osteoklastendifferenzierung durch Hemmung der c-Fos/NFATc1-Signalkaskade.

Die Bildung von neuer Knochenmatrix wird außer von diesen beschriebenen Mechanismen noch durch das lösliche Molekül Sclerostin reguliert. Im Ruhezustand exprimieren die Osteozyten das Sclerostin, welches LRP5/6 (*low density lipoprotein*

receptor-related protein 5/6) bindet und den Wnt-Signalweg hemmt, der die Knochenbildung induziert. Durch mechanische oder hormonelle Signale (z. B. PTH) wird die Expression von Sclerostin durch die Osteozyten inhibiert und somit der Wnt-Signalweg für die Knochenneubildung freigegeben (Raggatt und Partridge 2010).

Sind etwa soviel Knochenmatrix durch Osteoblasten wieder aufgebaut wie zuvor abgebaut worden, so wird der Resorptionszyklus beendet. Der Sclerostinspiegel kehrt wieder zurück und erhöht sich. Somit wird erneut der Wnt-Signalweg gehemmt und die osteoblastische Knochenmatrixlieferung beendet. Das zurückgebliebene neue Osteoid mineralisiert erneut die Knochenoberfläche und geht in den Ruhezustand zurück. Die Osteoblasten hingegen gehen entweder in die Apoptose ein, lagern sich als *bone linings cells* auf die Knochenoberfläche oder werden als Osteozyten in die Knochenmatrix eingebettet (Raggatt und Partridge 2010).

1.2 Osteoklastendifferenzierung: Historische Entwicklung

In den frühen 70er Jahren wurde angenommen, dass die Osteoklasten und Osteoblasten gemeinsam aus den gleichen Knochenvorläuferzellen entstanden und zu einem späteren Zeitpunkt in den Osteoprogenitor Pool wieder einmündeten (Fornadley et al. 1990). Auch andere Theorien über den gemeinsamen Ursprung der Osteoklasten und Osteoblasten wurden in dieser Zeit aufgestellt. Ein weiteres Beispiel wäre die von Rasmussen im Jahre 1974. Rasmussen hatte die Ansicht, dass die mesenchymalen Zellen zuerst zu Präosteoklasten differenzieren und von denen ein Osteoklast durch Fusion gebildet werden konnte. Anschließend sollten zu einem bestimmten Zeitpunkt die Präosteoblasten sich aus den Osteoklasten entkoppeln, um folglich zu reifen Osteoblasten und Osteozyten heranzureifen (Martin 2013). Erst Mitte der 70er Jahre kamen die ersten Beweise für den unterschiedlichen Ursprung der Osteoblasten und Osteoklasten. Durch verschiedene Experimente und Modellsysteme konnte man zeigen, dass die Osteoklasten dem Knochen aus dem zirkulierenden System zugeführt wurden und durch Fusion von mononuklearen Vorstufen der hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammen. Ein wichtiges Ereignis in diesen Jahren war die Erkenntnis von der Mobilität der Osteoklasten. In vielen Studien wurde festgestellt, dass im Knochen die Osteoklasten im Gegensatz zu den Osteoblasten spärlich verteilt waren (Martin 2013). Somit wurde postuliert, dass die Osteoklasten erst bei Bedarf zu dem Ort der Resorption gelangten, wobei die Osteoblasten hingegen lokal und ständig angesiedelt waren. Dadurch wurde erneut die Theorie des gemeinsamen Ursprungs der zwei Zellen widerlegt.

Zuerst schien es, dass sich die zwei Zellreihen abgekoppelt und unabhängig voneinander entwickelt hätten. Jedoch wurde dieses Erkenntnis durch die Beobachtung erneut revidiert. In einem Co-Kultur System mit hämatopoetischen Zellen aus einer embryonalen Mausleber und fetalen Knochenrudimenten wurde die Notwendigkeit von lebenden Knochenzellen für die Osteoklastenentwicklung dargestellt (Burger et al. 1984). Den endgültigen Beweis lieferte jedoch wenig später Takahashi mit seinen reproduzierbaren Experimenten über die Osteoklastenbildung. Takahashi beobachtete in Maus-Knochenmark Kulturen, dass in durchweg 90% der Fälle TRAP-positive einkernige Zellhaufen und multinukleäre Zellen in der Nähe von mononukleären ALP-positiven Zellen (Osteoblasten) lokalisiert waren. Dieses stand im Einklang mit der Vorstellung, dass die Osteoblasten an der Osteoklastenentwicklung beteiligt waren. In weiteren Versuchen mit Co-Kultursystemen, in denen osteoblastenreiche Zellen aus Maus-Schädeldecken mit Osteoklastenvorläuferzellen aus der Milz gezüchtet wurden, gelang es schließlich die Notwendigkeit des direkten Kontaktes von Osteoblasten und Osteoklasten darzustellen (Takahashi et al. 1988).

1.2.1 RANK/RANKL/OPG- Systems

Nachdem die Bedeutung der Interaktion zwischen den Osteoblasten und Osteoklasten erkannt worden war, hat man sich zu der Aufgabe gemacht, die dazugehörigen Faktoren zu ermitteln. Zuerst schien das von den Stromazellen sezernierte M-CSF (Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) für die Regulation der Osteoklastendifferenzierung zuständig zu sein. Takahashi beobachtete, dass eine Mutation im kodierenden Bereich des M-CSF-Gens in der Maus die Fähigkeit, mehrkernige Osteoklasten zu bilden, beeinträchtigte (Takahashi et al. 1991). In weiteren Versuchen konnte schließlich nachgewiesen werden, dass M-CSF sowohl für die Proliferation als auch für die Differenzierung der Osteoklasten unverzichtbar war (Tanaka et al. 1993). Gleichwohl erfüllte das M-CSF nicht die Kriterien der osteoblastischen Abstammung.

Im Jahre 1997 gelang jedoch der Durchbruch durch die Entdeckung von Osteoprotegerin (OPG), ein lösliches Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie. OPG erwies sich als ein starker Inhibitor der Osteoklastenbildung (Kurihara et al. 1990; Simonet et al. 1997). Diese Entdeckung eröffnete den Weg zu der Identifikation der Osteoklastenbildung durch den stimulierenden Faktor, der als 'Rezeptor-Aktivatoren von NF- κ B' Liganden (RANKL) bezeichnet wurde (Lacey et al. 1995; Yasuda et al. 1998). RANKL aus der Familie der Tumornekrosefaktoren bindet an seinen Rezeptor, der auf der Membran von

Osteoklastenvorläuferzellen und reifen Osteoklasten exprimiert wird und induziert somit die Differenzierung, Reifung und Aktivierung der Osteoklasten (Boyce und Xing 2008).

Nun hatte man zwei Zytokine (OPG, RANKL) beschrieben, die die Kriterien des osteoblastischen Ursprungs und der Regulation der Osteoklastendifferenzierung erfüllten. Die osteoklastäre Differenzierung wird derweilen noch von den Osteozyten unterstützt, die das M-CSF und RANKL bei einem Stimulus zusätzlich sezernieren können. Die Produktion von RANKL/OPG wird durch Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine, die jeweils eine unterschiedliche Wirkung auf die Produktion von RANKL und OPG haben, beeinflusst.

1.2.2 Histochemische Osteoklastenmarker

Die Osteoklasten sind durch eine Anzahl von verschiedenen Oberflächenproteinen gekennzeichnet. Durch diese ist es möglich, sie sowohl zu identifizieren als auch eine Aussage über ihren Aktivitäts- und Reifezustand zu treffen. Zu diesen zählen u. a. Tartrat-resistente Saure Phosphatase (TRAP), Cathepsin K, Vitronektin-Rezeptor (VNRT), MMP9, Calcitonin Rezeptor und RANK (Takeshita et al. 2000).

Die Funktion von TRAP besteht im Abbau der bei der Knochenresorption anfallenden Substanzen, wie Hydroxylapatit und Kollagen-Typ I, durch die Bildung von intrazellulärem reaktivem Sauerstoff. Die Expression von TRAP korreliert hierbei mit der Anzahl der Osteoklasten und kann für die Bestimmung herangezogen werden (Ballanti et al. 1997). Das Cathepsin K und MMP9 sind für den Abbau des organischen Teils der Knochenmatrix zuständig (Ghayor et al. 2011). Der Vitronektin-Rezeptor dient der Anheftung der Osteoklasten an den Knochen, die so einen isolierten Bereich bilden. Der Calcitonin Rezeptor dient der hormonellen Signalweiterleitung und das RANK für die Induktion und Differenzierung der Osteoklasten (Schvartz et al. 1999).

1.2.3 Zytokine bei der Osteoklastendifferenzierung

Die direkte Wirkung von Zytokine auf die Osteoklastendifferenzierung ist in der Literatur spärlich beschrieben. Der Fokus liegt eher auf der Interaktion von Osteoblasten und Osteoklasten. Allgemein gilt jedoch, dass die Expression von RANKL der Hauptinduktor für die Osteoklastogenese ist. Diese Expression wird durch verschiedene Zytokine (z. B. IL-1 β , IL-6 und TNF- α), die auch in dieser Arbeit untersucht wurden, auf der Genebene hoch- und runterreguliert.

Interleukin-1 β ist ein proinflammatorisches und multifunktionales Zytokin, das u. a. ein wichtiger Vermittler bei der peripheren Immunantwort während der Zeit von Infektionen und Entzündungen ist (O'Neill 2000). Zugleich ist IL-1 β bei knochenzerstörenden Prozessen aktiv beteiligt, die bei einer Vielzahl verschiedener Krankheiten wie Osteoporose, rheumatoide Arthritis oder entzündlichen Darmkrankheiten zu sehen sind (Findlay und Haynes 2005; Nakamura und Jimi 2006). Das Zytokin induziert die Differenzierung, Fusion der Monozyten und Aktivität der Osteoklasten. Der Effekt wird weniger über die direkte Wirkung auf Osteoklasten erreicht. Vielmehr ist er auf einen synergistischen Prozess mit RANKL sowie TNF- α und daraus folgender vermehrter Expression von Interleukin-1 Rezeptor zurückzuführen (Kim et al. 2009).

Die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor aktiviert zwei Hauptsignaltransduktionswege, den STAT-3 und MAP-Kinaseweg. Diese induzieren die Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten. Dabei ist der indirekte Effekt durch die Produktion von osteoblastären RANKL fördernd. Der direkte Effekt wird als inhibitorisch auf die Osteoklastogenese durch den STAT-3-Signalweg beschrieben (Duplomb et al. 2008). In der Literatur sind auch kontroverse Effekte auf die direkte Wirkung von IL-6 durch den STAT-3-Signalweg geschildert. Kim et al. haben demonstriert, dass die Hemmung des Signalweges STAT-3 zu einer kompletten Ausschaltung der Osteoklastogenese führt (Kim et al. 2007). Zhang hingegen zeigten eine gesteigerte Zahl an Osteoklasten bei STAT-3-Knockout-Mäusen (Zhang et al. 2005). Für ein besseres Verständnis soll der direkte und indirekte Effekt von IL-6 auf die Osteoklastogenese in dieser Arbeit untersucht werden.

Tumornekrosefaktor alpha wird von Monozyten, Makrophagen und T-Zellen produziert. Bezüglich der Osteoklasten spielt er eine wichtige Rolle in der Differenzierung, Aktivierung und Apoptose (Azuma et al. 2000; Kobayashi et al. 2000). In Anwesenheit von TNF- α wird schon bei einer geringen Konzentration von RANKL die Osteoklastendifferenzierung eingeleitet. Die Wirkung von TNF- α beruht auf der einen Seite in der Verstärkung des Effektes von RANKL und auf der anderen Seite in der erhöhten Expression von RANKL in Stromazellen (Lam et al. 2000). TNF- α wird auch ein direkter Effekt durch die erhöhte

Expression von RANK auf Makrophagen zugeschrieben. Nichtsdestotrotz ist auch bei TNF- α der genaue Prozess in Hinsicht auf die Osteoklastendifferenzierung noch nicht vollständig geklärt (Kitaura et al. 2013).

1.3 Morbus Crohn: Definition

Morbus Crohn ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die vom Mund bis zum After jeden Teil des gastrointestinalen Verdauungstraktes betreffen kann. Sie bezeichnet eine meistens schubweise auftretende Entzündung der transmuralen Darmschleimhaut, die vor allem aber im terminalen Ileum und Colon gehäuft auffindbar ist. Spezifisch handelt es sich um eine chronisch-granulomatöse Entzündung mit extraintestinalen Manifestationen und assoziierten Immunerkrankungen (Baumgart und Sandborn 2012). Der diskontinuierliche und segmentale Befall der transmuralen Darmschleimhaut wird als das Charakteristikum dieser Krankheit definiert. Die Patienten leiden an rezidivierenden Entzündungen mit Magen- und Darmbeschwerden wie Bauchschmerzen, blutigen Durchfällen, Darmverschlüssen, Strikturen, Fisteln und Fieber (Khor et al. 2011). Auch wenn der Morbus Crohn nicht mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist, sind die eben beschriebenen Beschwerden der Grund für den großen Verlust an der Lebensqualität.

1.3.1 Epidemiologie in zeitlicher Dynamik

In der Literatur werden unterschiedliche epidemiologische Daten zu der Inzidenz und Prävalenz von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen angegeben. Dieses ist zum einen sowohl durch den sozioökonomischen sowie ethnischen Unterschied der Population bei der Datenerhebung als auch zum anderen der hohen Anzahl an beeinflussenden Faktoren, die unterschiedlich einbezogen werden, zurückzuführen.

Die Inzidenzraten bei Morbus Crohn haben sich in den westlichen Ländern und in den Entwicklungsländern, wenn auch nicht sehr stark ausgeprägt, seit den 1970er Jahren zugenommen. Die höchsten Inzidenzen finden sich in Nordamerika, Großbritannien und im nördlichen Teil Europas. Nichtsdestotrotz kann man die Inzidenzrate zwischen 3,3 bis 9,2 von 100.000 Menschen pro Jahr einordnen (Hovde und Moum 2012). Auch bei der Prävalenz sind unterschiedliche Angaben in der Literatur beschrieben. In Europa variiert die Prävalenzrate von unter 10 bis 150 bei 100.000 Einwohnern (Jussila et al. 2012).

Zudem besteht ein deutliches Nord-Süd-Gefälle weltweit, sowie eine höhere Inzidenzrate in Populationen, welche in höheren Breiten wie Skandinavien, Kanada, Australien lokalisiert sind (Hovde und Moum 2012).

Der Anstieg der Prävalenz in der zweiten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts vor allem in Europa und Nord Amerika ist mit dem westlichen Lebensstil in Zusammenhang zu bringen (Loftus 2004).

1.3.2 Altersgipfel und Geschlechterverteilung

Der Morbus Crohn hat eine zweigipflige Altersverteilung. In der Literatur wird ein vermehrtes Auftreten der Krankheit um das 20. bis 30. Lebensjahr und ein weniger ausgeprägtes Auftreten um das 60. bis 70. Lebensjahr beschrieben. Dabei sind mehr Frauen betroffen, und das Rauchen gilt als ein wichtiger Risikofaktor (Hovde und Moum 2012).

1.3.3 Umweltfaktoren

Neben dem Rauchen ist auch die Appendektomie, eine starke Hygiene mit geringen Darmbakterien und Parasiten als Risikofaktor beschrieben. Es wird auch ein Zusammenhang zwischen Mykobakterien und die Entstehung von Morbus Crohn diskutiert.

1.3.4 Ethnisch soziökonomischer Unterschied

Es zeigt sich eine geringere Inzidenz bei Nicht-Europäern, Lateinamerikanern und Asiaten im Gegensatz zu den Europäern. Wandert jedoch die Population von einem Gebiet mit niedriger Inzidenz und Prävalenz in ein Gebiet mit höherer, so passen sich auch in dieser Population die Inzidenz -und Prävalenzraten nach der 2. bis 3. Generation dem ausgewanderten Ort an. Eine deutlich höhere Inzidenz wird jedoch bei Ashkenazy-Juden und Populationen in Stadtgebieten im Gegensatz zu ländlichen Gebieten beobachtet (Hovde und Moum 2012).

1.3.5 Krankheitsbild

Zu den ersten Anzeichen der Krankheit zählen abdominale, teils kolikartige Unterbauchschmerzen, die rezidivierend auftreten und mit wässrigen Diarrhöen verbunden sind. Etwa zwei Drittel der Patienten leiden unter Gewichtsverlust. Die Krankheit weist auch viele Komplikationen auf, wie eitrige Abszesse, Fisteln und Darmverschlüsse. Charakteristisch für die Krankheit ist auch die extraintestinale Manifestation. Fast die Hälfte der Patienten leiden unter diversen Symptomen wie

Hauterscheinungen (Erythema nodosum), Gelenkbeschwerden (Arthritis) oder auch an einer Entzündung der Augen (Uveitis). Neben den typischen Merkmalen wird die Krankheit meistens auch von der allgemeinen B-Symptomatik wie Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß begleitet.

1.3.6 Pathogenese und Ätiologie

Die weit verbreitete Hypothese zu der Pathogenese von Morbus Crohn ist eine abnorme und kontinuierliche Immunantwort auf Mikroben im Darm, die zugleich durch die genetische Anfälligkeit des Individuums katalysiert wird. Die Immunantwort wird hauptsächlich durch übermäßig aggressiv erworbene T-Zellen gegenüber einem Teil der Darmbakterien getragen. Die genetische Anfälligkeit des Einzelnen, die äußeren Umgebungen und die mikrobielle Darmflora sind weitere separate Komponenten, die diese komplexe Theorie vervollständigen (Sartor 2006; Boyapati et al. 2015). Neben der abweichenden Immunregulation spielen auch persistierende spezifische Infektionen und defekte Schleimhautbarrierefunktionen in der Theorie der Ätiologie eine Rolle. Ausschlaggebend ist auch das abnorme Verhältnis von positiven und schädlichen Mikroben, welches als Dysbiose bezeichnet wird (Sartor 2006; Boyapati et al. 2015).

Interessant ist auch die Entwicklung der genetischen Komponente, die im Jahre 2001 mit der Entdeckung des Gens NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*) begann (Ogura et al. 2001). Das NOD2-Gen-kodierte Protein gehört zu der Klasse der Pattern-Recognition-Rezeptoren, welche Pathogene anhand von charakteristischen Mustern erkennen und das angeborene Immunsystem aktivieren. Das NOD2-Protein erkennt vor allem das bakterielle Muramyl-Dipeptid und startet den NF- κ B-Signalweg, welcher sowohl anti-apoptotische Signale in der Zelle vermittelt als auch die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β und IL-12 (Le Bourhis et al. 2007).

Ein anderer potenzieller Mechanismus, der in der Literatur diskutiert wird, ist die Induktion der Autophagie durch das NOD2 Protein und seine Interaktion mit ATG16L1. Bei einer Morbus-Crohn-assoziierten NOD2- und ATG16L1-Variante weist die Induktion der Autophagie einen Defekt auf und rückt somit die Autophagozytose als Schlüsselmechanismus in den Mittelpunkt (Fritz et al. 2011).

Ein weiterer Hinweis für die genetischen Aspekte sind die erhöhten Konkordanzraten bei Zwillingsstudien beispielsweise bei eineiigen Zwillingen (35-58%) im Vergleich zu zweieiigen Zwillingen (3-7%). Fünf bis zehn Prozent der weisen eine positive

Familienanamnese auf, die einen weiteren Hinweis für die genetische Komponente darstellt (Bonen und Cho 2003).

1.3.7 Risikofaktoren und klinische Folgen

Seit den 90iger Jahren wird in der Literatur eine erhöhte Prävalenz von Schenkelhals -und Wirbelsäulenfrakturen bei chronisch entzündlichen Darmkrankheiten aufgeführt. Bis zu 50% der Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa leiden an einer Osteoporose oder Osteopenie (Miznerova et al. 2013). Das relative Risiko für eine Fraktur bei jener Krankheit liegt bei einer Spannweite von 1,19 bis 2,5. Ein besonderes Augenmerk liegt auf dem Alter der Patienten mit Morbus Crohn und einer Osteoporose. Im Vergleich zu der durchschnittlichen Prävalenz mit 12% bei 65 jährigen, sind die Morbus-Crohn-Patienten in der zweiten und dritten Lebensdekade mit einer Prävalenz von ca. 22% fast doppelt so häufig und in viel jüngeren Jahren betroffen (Lakomek et al. 2012).

Diese erhöhte Prävalenz bei Morbus-Crohn-Patienten ist durch multifaktorielle Risikofaktoren bedingt. Dazu zählen neben der genetischen Prädisposition, endokrine und metabolische Faktoren, nahrungsbedingte Aspekte und vor allem Entzündungsmediatoren wie z. B. IL-1 β , IL-6, TNF- α , RANK/RANKL und OPG, die man bei Morbus-Crohn-Patienten in einer bestimmten Konzentration und Kombination gemessen hat (Lakomek et al. 2012).

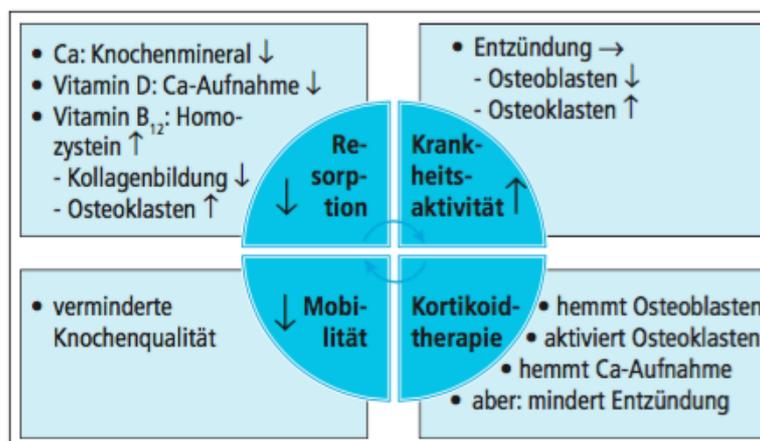


Abbildung 3: Komplexität der Osteoporoseentwicklung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Lakomek et al. 2012). „Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlags.“

1.4 Therapiemöglichkeiten und neue Ansätze bei Morbus-Crohn-bedingter Osteoporose

Für die genaue Therapieoptimierung ist ein Blick in den Verlauf der Krankheitssymptome bei Morbus Crohn entscheidend. Nur die Hälfte der Patienten hat einen dauerhaften Bedarf an aggressiven Medikamenten. Ein Drittel dieser Patienten leidet unter einem intermittierenden und ca. 20% an chronisch persistentem Krankheitsverlauf. Die restlichen 50% werden gut mit einer Schubtherapie behandelt. Dabei werden bei einem akuten Schub mit milderem Verlauf, anstelle systemischer Substanzen, topisch wirkende Substanzen bevorzugt, die aufgrund ihres geringeren Nebenwirkungsprofils eingesetzt werden. Erst bei schwerer entzündlicher Aktivität sind systemische Steroide zu bevorzugen. Bei einer Steroidresistenz oder Steroidabhängigkeit werden Immunsuppressiva in das Therapieschema aufgenommen. Dazu zählen Purinpräparate wie Azathioprin und 6-Mercaptopurin und Anti-TNF-AK wie Infliximab und Adalimumab. Besonders der Einsatz von Anti-TNF-AK in früheren Stadien wird eher ablehnend angesehen. In den Leitlinien von 2014 wird der Einsatz von Anti-TNF-AK bei kurzer Krankheitsdauer befürwortet und bei längerer Krankheitsdauer eher ablehnend angesehen. Da auch in dieser Dissertationsarbeit auf die TNF- α Konzentration und den Zusammenhang der Osteoklastendifferenzierung hingewiesen wird, ist der TNF-AK nicht nur für die Pathogenese des Morbus Crohn entscheidend, sondern auch für Morbidität und Osteoporoseprävention. Neben diesen Biologika ist auch die Substitution von Kalzium, Vitamin D und Vitamin B12 entscheidend für die Erhaltung der Knochendichte. Für die Knochenfrakturprävention ist darüber hinaus der Einsatz von Bisphosphonaten wichtig und wird leitliniengerecht bei einer bereits vorliegender Osteopenie (T-Wert <1,5) empfohlen (Hoffmann et al. 2008).

Ein neuer Antikörper gegen das Integrin- $\alpha 4\beta 7$, welches selektiv die Einwanderung von Lymphozyten in die Darmwand verhindert, scheint in neuester Zeit vielversprechend zu sein. Besonders der Einsatz bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa, die unter Anti-TNF-Therapie kein gutes Ansprechen zeigen, macht diesen neuen Antikörper besonders bedeutend (Rosario et al. 2017).

Auch sind sogenannte „Biosimilars“, biochemische Nachahmwirkstoffe, die jedoch nicht mit ihrer Originalsubstanz identisch sind, als bald zu erwartende Therapieoptionen anzusehen. Ebenso sind auch neben den TNF- α - und Zytokinantikörper, die Blockade der Signaltransduktionskaskade durch z. B. Januskinase-Inhibitoren, im ständigen Forschungsmittelpunkt und in naher Zukunft als eine weitere Therapiemöglichkeit bei Morbus Crohn zu erwarten (Olivera et al. 2017).

1.5 Fragestellung

Morbus Crohn ist assoziiert mit einer erhöhten Prävalenz einer Osteoporose – einer Komplikation, die zunehmend als Ursache von signifikanter Morbidität anerkannt wird. Die Pathogenese ist noch umstritten, jedoch gilt sie als eine der wichtigsten Einflüsse der Krankheitsaktivität, insbesondere der Konzentrationsanstieg der Zytokinkombination (IL-6, IL-1 β , TNF- α).

In dieser Doktorarbeit soll die Frage beantwortet werden, ob die Zytokinkombination, wie sie bei Patienten mit Morbus Crohn gemessen wurde, auf die Differenzierung der Osteoklasten eine Wirkung haben. Hierfür sollen die Osteoklasten aus *buffy coats* isoliert, für 14 bis 21 Tage mit den Zytokinen kultiviert und anschließend die Genexpression der osteoklastenspezifischen Marker bestimmt werden.

Weiterhin soll mit dieser Arbeit beantwortet werden, ob die erhöhte Prävalenz der Osteoporose bei Morbus-Crohn-Patienten durch eine erhöhte Aktivität der Osteoklasten zustande kommt. Hierfür soll eine Reihe von Aktivitätsbestimmungen der Osteoklasten durchgeführt werden.

Zum Schluss soll mittels Western Blot die Wirkung der Zytokine auf die Differenzierung von Osteoklasten in der Proteinebene bestimmt werden.

Am Ende der Versuchsreihen soll ein fertiges System etabliert werden, welches es ermöglicht, weitere systematische Untersuchungen mit den Osteoklasten durchzuführen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Für die Untersuchung des Effektes von Zytokinen auf die Osteoklastendifferenzierung wurden Monozyten benutzt, die aus gespendeten *buffy coats* mit dem MACS-System isoliert wurden. Die *buffy Coats* stammten jeweils von unterschiedlichen Spendern aus dem Blutspendedienst Universität Göttingen, deren Einverständniserklärung für die Nutzung zu Forschungszwecken vorlag. Der Ethikantrag Dok_34_2013 wurde am 25.04.2013 genehmigt. Im weiteren Verlauf wurden die isolierten Monozyten kultiviert, stimuliert und mit verschiedenen Mediatoren behandelt. Die aus den Monozyten gereiften Osteoklasten wurden mit spezifischen Färbungen, Genanalysen und Resorptionsanalysen untersucht. Angegeben sind alle Bestandteile, die für die einzelnen Versuche benutzt wurden.

2.1.1 Verwendete Geräte und Materialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien

Material	Hersteller
Falconröhrchen	Becton-Dickinson, Mountain View, USA
MACS-Säule	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS-Magnet	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS-Stempel	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Einmalpipetten 10 ml	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym, Hessisch-Oldendorf
Flüssigstickstoff-Kontainer	Cryoson, Schöllkrippen
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
6er-Wellplatte	Falcon, North Carolina, USA
2er-Wellplatte	Falcon, North Carolina, USA
24er-Wellplatte	Falcon, North Carolina, USA
Petrischale 9,4 x 1,6 cm	Greiner, Nürtingen
Kulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Reaktionsgefäß 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Fotokamera	Canon, Tokio, Japan
Sterifilter Minisart	Sartorius, Göttingen
Absaugpumpe	Schütt, Göttingen
Mikroskop	Leica, Wetzlar
Bunsenbrenner	Schuett, Göttingen
Brutschrank Stericult 2000 Inkubator	Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
Sterilbank	Cearg Schirp, Bork, Nordrhein-Westfalen
Wasserbad	Gebr. Rettberg, Göttingen
Zentrifuge Zelllabor	Hettich, Lauenau
Zellschaber	Sarstedt, Newton, USA
Kühlschrank	Liebherr, Hamburg

2.1.2 Verwendete Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien

Material	Hersteller
buffy coat	Blutspendedienst, Göttingen
PBS (- CaCl ₂ , - MgCl ₂)	PAA, Pasching
EDTA	Sigma, München
Ficoll	GE Healthcare, Freiburg
FCS (fetales Kälberserum)	PAA, Pasching
RPMI	PAA, Pasching
Percoll	GE Healthcare, Freiburg
MACS-Puffer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD14- Beads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Dulbeccos MEM (DMEM)	PAA, Pasching
L-Glutamin-Lösung 200 mM	Gibco BRL, Cölbe
Penicillin/Streptomycin (je 100 U/ml)	Gibco BRL, Cölbe
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco BRL, Cölbe
TRAP-Färbung	Sigma, München
Toluidinblau-Färbung	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
RLT-Buffer (aus RNeasy mini Kit)	Qiagen, Hilden
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe
70 % Ethanol	J.T. Backer, Deventer, Holland
RANKL	PeproTech, Hamburg
M-CSF	PeproTech, Hamburg
TNF- α	Gibco BRL, Cölbe
IL-6	Gibco BRL, Cölbe
IL-1 β	Gibco BRL, Cölbe
<i>cell dissociation solution</i>	Sigma, München
<i>rabbit Serum</i>	DAKO, Waldbronn
35 % Albumin	Sigma, München
Antikörper für Western Blot	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.3 Materialien für die RT-PCR

Tabelle 3: Material für RT-PCR

Material	Hersteller
5 x RT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP (0,1 μ mol/ μ l); TTP, GTP, CTP, ATP	Roche, Mannheim
DTT (0,1 mol/l)	Invitrogen, Karlsruhe
P(dT) 15 – Primer (11 μ M)	Roche, Mannheim
RNase-Inhibitor (40 U/ μ l)	Roche, Mannheim
M-MLV(200 U/ μ l)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>thermocycler primus</i>	MWG-Biotech, Ebersberg
<i>thermocycler primus advanced 96</i>	PeqLab, Erlangen
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch-Oldendorf

Für die Darstellung der Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten, wurden die osteoklastenspezifischen Färbungen Toluidinblau sowie TRAP-Färbung benutzt. Dabei handelt es sich um Lösungen, die von den Firmen für die Färbungen mitgeliefert werden und von denen die Konzentration nicht bekannt ist.

2.1.4 Toluidinblau-Färbungen

Tabelle 4: Material für Toluidinblau-Färbung

1M 3% Na-hypochlorit-Lsg.
650 µl 1xPBS
0,0001 % Toluidinblau-Lsg.
0,01 % Toluidinblau-Lsg.

2.1.5 TRAP-Färbung

Fixierlösung:

Tabelle 5: Material für TRAP-Färbung

65 ml Aceton
8 ml 37 % Formaldehyd
25 ml Citratlösung

Die Fixierlösung wurde in Glasflaschen bei 2°C-8°C aufbewahrt und vor jedem Gebrauch auf 18°C-26°C erwärmt. Die angesetzte Fixierlösung ist für einen Zeitraum von ca. zwei Monaten haltbar.

SLP-Lösung:

Tabelle 6: Material für SLP-Lösung

0,5 ml Fast-Garnet GBC Lösung
0,5 ml Natriumnitrit-Lösung
30 s geschüttelt und anschließend 2 Minuten stengelassen.
45 ml H₂O bidest (37 °C)
0,5 ml Naphthol AS-BI Phosphorsäurelösung
2 ml Acetatlösung
1 ml Tartratlösung

Die SLP-Lösung wurde bei jeder Färbung neu angesetzt. Als Kontroll SLP-Lösung wurde die gleiche Zusammensetzung, aber ohne 1 ml Tartratlösung verwendet. Für die Gegenfärbung kam Hämatoxylin-Lösung zu der Anwendung. Die oben aufgeführten Bestandteile und die Lösungen entstammen aus dem Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit 378A von Sigma.

2.1.6 24-Well-Färbung

Bei der Analyse der Resorption der Osteoklasten wurde eine Silbernitrat-Färbung für die Darstellung der Osteoklastenaktivität auf eine speziellen SAOS-2-Zellen beschichtete 24er-Wellplatte eingesetzt. Diese 24-Wellplatte wurde uns freundlicher Weise von Frau Ute Hempel von der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus, Institut für physikalische Chemie, TU Dresden bereitgestellt (Lutter et al. 2010). Fixierung der Zellen sowie Silbernitrat-Färbung:

Tabelle 7: Fixierlösung

3 % Hypochlorid, PBS
Für die Silbernitrat-Färbung:
10 % Formalin
1 % Silbernitrat-Lsg.
5 % Na-Carbonat
5 % Na-Thiosulfat
1 % Pyrogallol

2.1.7 Realtime-PCR-Primer

Tabelle 8: Realtime-PCR-Primer

Gene	Sequenz
Actin	S: ctggaacggggaaggtgacg AS: agtcctcggccacattgtga
TRAP	S: gaccaccttgcaatgtctctg AS: tggctgaggaagtcactgagttg
Cathepsin K	S: tgaggcttctcttggtgtccatac AS: aaaggggtgcattactgcggg
MMP 9	S: cgcagacatcgtcatccagt AS: gattggccttgaagatga
VNRT	S: actcaagcaaaaggagcaat AS: agattcatcccgcagatacgc
RANKL	S: accagcatcaaaatccaag AS: taaggaggggttgagacct
TNF- α	S: cccaggcagtcagatcatcttc AS: agctgccctcagcttga
IL-1β	S: aattgagtctgccagttccc AS: agtcagttatatcctggccgcc
IL-6	S: tggctgaaaagatggatgct AS: aactccaaaagaccagtgatgatt
11β-HSD1	S: aatccatgcaggaagatcc AS: caggttgacctatgacttg
RANK	S: ggtgcagcctctaactcctg AS: ttgagaccaggctgggtaac

2.1.8 Immunfärbung

Tabelle 9: Material für Immunfärbung

Fixierung:	PBS, 70 % kaltes Ethanol,
Blockierung:	H₂O, 35 % Albumin, Rabbit Serum, PBS
Färbung:	PBS, AK AlexaFluor 488 rabbit anticoat, DAPI

2.1.9 Proteinvorbereitung

Tabelle 10: Material für die Proteinvorbereitung

Reagenz	Hersteller
Bovines Serumalbumin	Invitrogen, Karlsruhe
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Hepes	Sigma, Taufkirchen
NaCl	Merck, Darmstadt
MgCl₂	Merck, Darmstadt
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Merck, Darmstadt
NP-40	Sigma, Taufkirchen
Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim

2.1.10 Lysepuffer

Tabelle 11: Zusammensetzung des Lysepuffers

Reagenz	Konzentration
Hepes pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl₂	1,5 mM
EGTA	1 mM
Glycerin	10 %
NP-40	0,50 %
Proteaseinhibitor	1 Tablette
H₂O	10 ml

2.1.11 Western Blot

Tabelle 12: Material für Western Blot

Reagenz	Hersteller
H ₂ O dest.	Labor intern Destillationsanlage
<i>NuPage LDS Sample Buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
ColorPlus Prestained Protein Ladder	New England BioLabs, Ipswich, MA
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe
Schwämme	Invitrogen, Karlsruhe
Whatman-Papier	omnilab, Bremen
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, München
Blotkammer	Invitrogen, Karlsruhe
Transferpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Primärantikörper	R&D Systems, Minneapolis, USA
Sekundärantikörper	DAKO, Waldbronn
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt
Amersham ECL Plus Detection Solution Röntgenkassette	GE Healthcare, München
Röntgenkassette	Intas, Göttingen
Röntgenfilm	Konica Minolta, Langenhagen
Medical Film Processor SRX 101A	Konica Minolta, Langenhagen
<i>tween 20</i>	Sigma, Taufkirchen
<i>re blot plus strong Lösung</i>	Millipore Californien
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen

2.1.12 TBS-T

Tabelle 13: Lösung der Westernblot-Antikörper

TRIS HCl	24,2 g/l
NaCl	87,6 g/l
pH	7,5
Tween	5 ml

2.1.13 Image-J-Densitometrie

Tabelle 14: Image-J-Densitometrie

Produkt	Hersteller
Scanner DCP-7030	Brother, Bad Vilbel
Image-J-Densitometrie	http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/

2.2 Methoden

2.2.1 Monozytenisolation

Die Monozytenisolation wurde mit der speziellen Magnet Separationsmethode der MACS Technology durchgeführt. Mit MACS Technology ist es möglich, Zellsuspensionen mit Hilfe von Oberflächenantigenen in einem Magnet zu separieren.

Dabei werden die zu isolierenden Zellen mit super-paramagnetischen CD14-MACS *micro beads* gelabelt. CD14 (*cluster of differentiation*) sind Oberflächenproteine, die vor allem von Monozyten gebildet werden. Die super-paramagnetischen *beads* haben einen Durchmesser von 50 nm, sind biologisch abbaubar und sind durch die Konjugation mit monoklonalen Antikörpern sehr spezifisch gegen die gewünschten Oberflächenproteine (MACS Cell Separation).

In einem magnetischen Feld werden die zu separierenden Zellen durch die *beads* und der Konjugation mit Antikörpern gegen die Monozyten spezifischen CD14-Oberflächenproteine zurückgehalten und werden anschließend außerhalb des Magnetes nach der Trennung der unerwünschten restlichen Bestandteilen eluiert (positive Selektion).

Das Material für die Monozytenisolation stammte aus den *buffy coats* unterschiedlicher Spender, deren Einverständniserklärung für die Nutzung zu Forschungszwecken vorlag. Das 100 ml *buffy coat* wurde mit 100 ml 1xPBS (mit 1 mM EDTA) verdünnt und anschließend auf 6 x 50 ml Falcon-Röhrchen bei Raumtemperatur verteilt. Dabei wurde das verdünnte *buffy coat* auf jeweils 15 ml Ficoll geschichtet um einen Gradienten zu erzeugen.

Dieser Ansatz wurde bei 2000 rpm, 25 °C ohne Bremse mit 120 Sekunden Vorlauf für die Dauer von 25 Minuten zentrifugiert. Die dabei gebildete PBMC-Schicht wurde auf vier neue Falcon-Röhrchen verteilt und mit 1xPBS (mit 1 mM EDTA) auf 50 ml aufgefüllt und anschließend erneut 10 Minuten bei 1200 rpm mit Bremse zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS (mit 1 mM EDTA) und jeweiliger Zentrifugation wurde das Pellet vorsichtig durch Resuspendieren mit einer Eppendorf Pipette in eine Lösung mit 5 ml FCS und 45 ml 10 % RPMI ohne Phenolrot aufgenommen (4 gleiche Ansätze). Die Lösung mit den gewaschenen Pellets wurde nun auf 4 Percoll-Gradienten geschichtet, die sich folgendermaßen zusammensetzen:

Lösung A= 5 ml FCS + 45 ml (10 %) RPMI mit Phenolrot

Lösung B= 46,5 ml Percoll und 3,5 ml 10xPBS

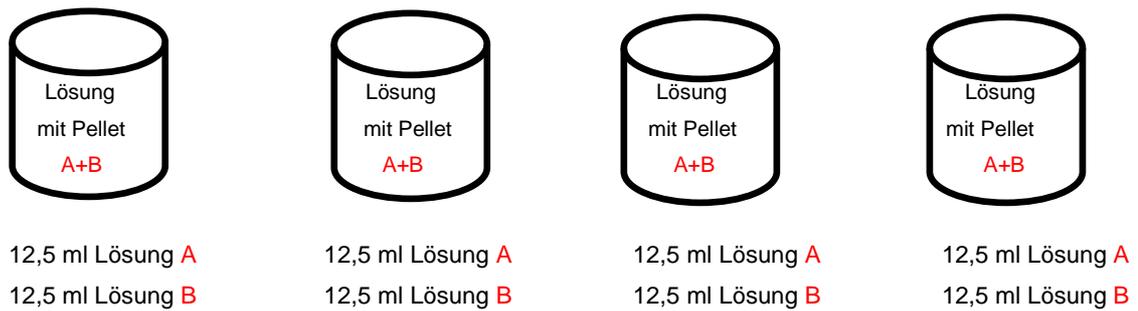


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Percoll-Gradienten

Nach der anschließenden Zentrifugierung der Gradienten bei 2000 rpm, ohne Bremse für 25 Minuten, wurde vorsichtig der Überstand entnommen und die Zellschicht in 2 neue Falcon-Röhrchen überführt, auf 50 ml aufgefüllt und erneut mit 1xPBS mit EDTA gewaschen. Der Waschvorgang wurde noch zweimal mit 1xPBS ohne EDTA wiederholt (Menck et al. 2014).

Mit der Neubauer-Zählkammer wurde nun die Anzahl der Zellen bestimmt (s. u.).

Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension erneut bei 1200 rpm mit Bremse für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellsuspension in MACS-Puffer (1xPBS ohne Calcium und Magnesium + 2 mM EDTA + 0,5% FCS) aufgenommen.

Dabei verdünnt man 1×10^7 Zellen in 90 μ l Puffer. Anschließend wurden die lichtempfindlichen CD-14 *beads* im Dunkeln und nach vorherigem Vortexen in einem Verhältnis von 10 μ l *bead* pro 1×10^7 Zellen dazugegeben und bei 4 °C für 15 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 ml MACS-Puffer hinzugefügt und für 10 Minuten bei 1200 rpm mit Bremse zentrifugiert. Das zentrifugierte Pellet wurde in 5 ml MACS-Puffer erneut aufgenommen und durch die MACS-Säule, welches sich im Magneten befindet und die zuvor mit 5 ml MACS-Puffer angefeuchtet wurde, durchgeschleust. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit jeweils 3 ml MACS-Puffer wurde die Säule aus dem Magneten genommen. Die entnommenen Zellen in der Säule wurden mit 5 ml MACS-Puffer und einem MACS-Stempel in ein neues Falcon-Röhrchen eluiert. Anschließend wurde erneut mit der Neubauer-Zählkammer die Anzahl der isolierten Monozyten bestimmt. Die oben beschriebene Separation erfolgte nach dem MACS Cell Separation Protokoll von Miltenyi Biotec.

2.2.2 Kultivierung und Zellanzucht

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit isolierten Monozyten wurden routinemäßig bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank in 2-,6- und 24-Wellplatten kultiviert und in einem Abstand von 3 Tagen mit frischem Medium versorgt. Die Anzahl der isolierten Monozyten betrug durchschnittlich 1.000.000 in 2 ml Medium. Für die weitere Differenzierung zu Osteoklasten wurden pro 1 ml Medium jeweils 5 µl RANKL (Endkonzentration 100 ng/ml) und 2,5 µl M-CSF (Endkonzentration 25 ng/ml) hinzugefügt. Die Differenzierungszeit betrug abhängig vom Versuch 14 bis 21 Tage.

2.2.3 Medium-Wechsel

Mit einer Pasteurpipette wurde das verbrauchte Medium bis zu der Hälfte aus dem Well entnommen und vorsichtig durch neues Medium ersetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Medium keine Beschädigung durch die direkte Zugabe auf die Zellen verursacht.

Das Medium, welches in dieser Promotionsarbeit für alle Versuche benutzt wurde, setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Medium

MEM-alpha + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep-Lsg. + 1 % 200 mM L-Glutamin

2.2.4 Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum von Morbus-Crohn-Patienten

Unabhängig von dieser Doktorarbeit wurden von Morbus-Crohn-Patienten Seren gesammelt und die Konzentration von IL-1 β , IL-6 und TNF- α gemessen. Anschließend wurde ein Mittelwert der Zytokinkonzentrationen errechnet. Immortalisierte Osteoblastenzellen (SCP-1-Zellen) wurden mit diesen Zytokinen (IL-6 + IL-1 β + TNF- α) in Kombination in der ermittelten Konzentration für 2 Tage stimuliert (Böcker et al. 2008). Nach 48 Stunden wurde der Zellkulturüberstand dieser Zellen aserviert. Der gewonnene Überstand der SCP-1-Zellen wurde noch einmal mit frischem Osteoklasten-Medium 1:2 verdünnt, da das erhaltene Material nicht mehr ausreichend Nährstoffe enthält, um als alleiniges Medium für eine Osteoklastenkultur zu fungieren. Die für 48 Stunden mit der Zytokinkombination vorbehandelten Überstände wurden in dieser Doktorarbeit für weitere Untersuchung in den Versuchen 3 und 4 verwendet.

2.2.5 Stimulierung von Zellen mit Zytokinen

Aus dem Versuch in 2.2.4 ging hervor, dass die Kombination von drei Zytokinen bei einer Konzentration einen Effekt auf die Osteoblasten haben und diese Konstellation von Zytokinen in Seren von Morbus-Crohn-Patienten auffindbar war (Blaschke et al. 2018). Der Effekt auf die Osteoklastendifferenzierung wurde bisher aber noch nicht beschrieben, welches im Rahmen dieser Promotionsarbeit erfolgen sollte. Die ermittelte Zytokinkonzentration in den Seren von Morbus-Crohn-Patienten betrug für IL-1 β ca. 1 pg/ml, für IL-6 ca. 10 pg/ml und für TNF- α ca. 10 pg/ml. Bei jeweiligem Mediumwechsel wurde die Zytokinkombination im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und zum Medium hinzugegeben.

2.2.6 Überstandgewinnung und inkubierte Zytokine

Aus der aufgestellten Theorie, dass nicht die alleinige Zytokinkombination für die erhöhte Osteoklastendifferenzierung zuständig ist, sondern ggf. weitere Mediatoren in dem Serum von Morbus-Crohn-Patienten verantwortlich sein könnten, die vor allem durch die Osteoblasteninduktion zustande kommen, wurden Osteoblastenversuche durchgeführt. Dabei wurden die Osteoblasten mit Zytokinen für 48 Stunden behandelt und anschließend jeweils Überstände abgenommen. Diese Überstände wurden bei -70 °C eingefroren und aufbewahrt. Als negative Kontrolle wurde die alleinige Zytokinkombination aus IL-1 β , TNF- α und IL-6 im Medium ohne Zellen für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend bei -70 °C eingefroren und aufbewahrt.

2.2.7 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Hierfür wurden die Zellen 1:10 mit 1xPBS ohne EDTA verdünnt. Die Auszählung der auf den Zählfeldern liegenden Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung 40-fach). Hierzu wurden 4 große Eckquadrate ausgezählt und ein Mittelwert ermittelt. Aufgrund der Fläche von 1 mm² jedes Eckquadrates und einer Kammerhöhe von 0,1 mm ergibt sich ein Volumen von 0,1 mm³. Für die Zellzahl je mm³ wurde der Multiplikationsfaktor Zehn verwendet, um es auf die Einheit μ l zu bringen.

2.2.8 Ablösen der Zellen

Beispielhaft wird hier das Lösen der Zellen aus einem Well für RNA aus Osteoklasten beschrieben:

Nach Entfernen des Mediums werden die Wells mit 2 ml PBS gewaschen. Die nun gewaschenen, aber noch auf dem Well fixierten Zellen, werden für 30 Minuten mit jeweils 1 ml pro Well *cell dissociation solution* inkubiert. Nach 30 Minuten erfolgt ein erneuter Waschvorgang mit jeweils 2ml PBS pro Well. Unter einem Abzug werden je Well 350 µl RLT-Buffer + 10 % Mercaptoethanol dazugegeben und gründlich mit einem Schaber die Zellen heruntergelöst. Jeweils zwei Well der abgeschabten Zellen werden in ein Cup zusammengeführt und bei -80 °C tiefgefroren und für den weiteren Schritt aufbewahrt.

2.2.9 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy-Mini-Kit und dem RNase-Free DNase Set durchgeführt. Die in dem RNeasy-Mini-Kit mitgelieferten speziellen Säulen (RNeasy spin column) binden selektiv mit ihrer Silika-Gel-Membran bis zu 45 µg RNA. Vor der Eluierung der RNA mit RNase-freiem Wasser, werden in mehreren Waschsritten Proteine und DNA entfernt.

In einem nächsten Schritt wurden die zu isolierenden Proben mit 350 µl 70 %-igem Ethanol aufgearbeitet und auf die RNeasy spin column überführt sowie abschließend abzentrifugiert. Dieses gewährleistete die alleinige Bindung der RNA an die Silika-Gel-Membran der RNeasy spin columns. Hierauf folgte ein Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer und die Benetzung der Membran mit 80 µl DNase Verdauung (RNase-Free DNase Set). Die Inkubationszeit mit der Verdauung betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift mit RW1- Puffer und zweimaliger Aufreinigung mit 500 µl RPE-Puffer. Die Eluierung im letzten Schritt erfolgte mit 20-30 µl RNase-freiem Wasser. Photometrisch wurde die RNA-Konzentration bestimmt und bei -80 °C eingefroren und aufbewahrt.

Die Zusammensetzung des Lysepuffers war wie folgt:

RLT-Buffer (Qiagen RNeasy Kit) + 1 % 2-Mercaptoethanol.

2.2.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung des RNA-Gehaltes

Mit dem Eppendorf Biophotometer wurde die Konzentration der RNA bestimmt. Hierbei wurde auf das Lambert-Beersche Gesetz zurückgegriffen, um mit der Absorption bei 260 nm über die optische Dichte indirekt die Konzentration der enthaltenen Nukleinsäuren zu bestimmen. Folgende Konzentrationen wurden bei einer optischen Dichte von 1 festgelegt:

$$OD1 = 40 \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$$

Die Proben wurden vor der Bestimmung des RNA-Gehaltes mit H₂O im Verhältnis 1:100 verdünnt. Vor der Bestimmung der Konzentration wurde der Photometer mit destilliertem H₂O geeicht. Das Verhältnis der OD₂₆₀ zu der OD₂₈₀ zeigte mit Werten zwischen 1,6-2,0 eine weitgehend proteinfreie RNA.

2.2.11 cDNA-Synthese

Die cDNA ist eine *copy*-DNA, die mittels des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert wird. Für die Umschreibung wurde die Reverse-Transkriptase des Moloney-Mäuseleukämievirus (m-MLV RT) eingesetzt. Diese synthetisierte nach Zugabe von Oligo dT-Primer und Nukleotiden den komplementären DNA-Abschnitt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tabelle 15: RT-PCR-Ansatz

Reagenz	Volumen
5 x RT-Puffer	8,0 µl
dNTP-Mix (10 mM)	8,0 µl
DTT (100 mM)	4,0 µl
p(dT)15 – Primer (11 µM)	8,0 µl
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
M-MLV (200 U/µl)	2,0 µl
RNA-Lsg + H ₂ O _{dest}	9,5 µl
Gesamt	40 µl

Tabelle 16: RT-PCR Transkriptionsprogrammeinstellung

Zeit	Temperatur
60 Minuten	38 °C
10 Minuten	72 °C
∞	4 °C

2.2.12 Realtime-PCR

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion ist es möglich, bekannte DNA-Abschnitte *in vitro* zu vervielfältigen. Die ersten Ideen zu dieser Standardmethode, die sich mittlerweile in allen Laboren etabliert hat, entstanden in den 70er Jahren von Kjell Kleppe. 1983 setzte der spätere Nobelpreisträger Kary Mullis die Idee von Kjell Kleppe in die Tat um und entwickelte erstmals die PCR (Mullis 1990). Voraussetzungen für eine funktionsfähige PCR sind zwei Primer, die die Startpunkte definieren. Zu der Synthese wurden thermostabile DNA-Polymerasen benutzt. Ein PCR-Zyklus besteht aus den Phasen Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung, die zyklisch wiederholt werden. Der Zyklus beginnt mit der Denaturierungsphase, in der die doppelsträngige DNA auf 95 °C erhitzt wird. In diesem, auch als Initialisierungsphase bezeichneten Zyklusabschnitt, werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotiden aufgebrochen und somit entsteht aus einer doppelsträngigen DNA ein DNA-Einzelstrang. Der folgende Zyklusschritt wird als Anlagerungsphase bezeichnet, in der die Primer an die einzelsträngige DNA bei einer Temperatur von ca. 60 °C binden. Anschließend folgt der dritte und letzte Zyklusschritt, die Verlängerungsphase. Hier wird die komplementäre DNA durch die thermostabile taq-Polymerase verlängert. Der neu synthetisierte DNA-Abschnitt ist in den ersten Zyklen länger als die komplementäre Matrizen DNA, da zu diesem Zeitpunkt kein Endpunkt definiert ist. DNA-Abschnitte mit definierter Länge entstehen erst im zweiten Zyklus, da nun hier der zweite Primer nur noch bis zum "ehemaligen Startpunkt" die DNA verlängert.

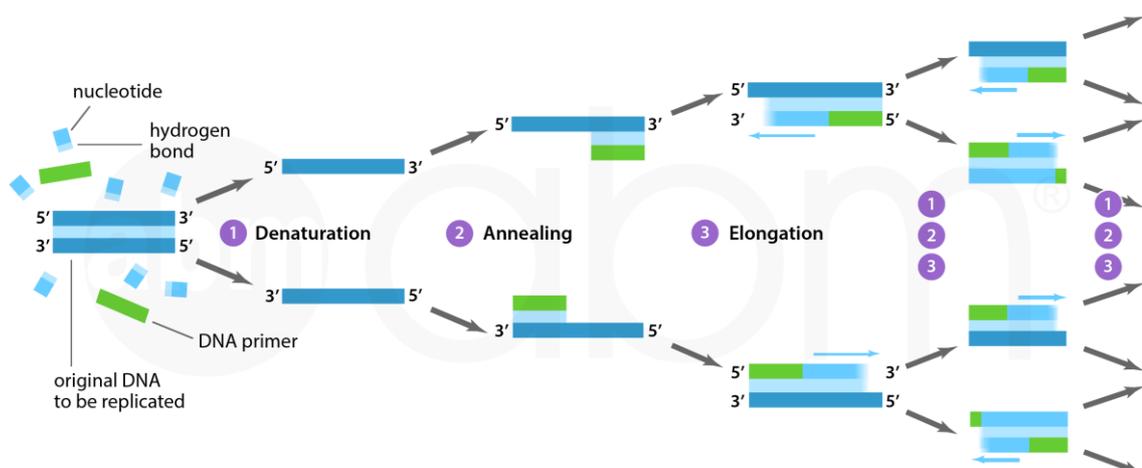


Abbildung 5: Dargestellt ist die Polymerase-Kettenreaktion mit Denaturierung, Annealing und Elongation (Shafique 2012). „Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Lambert Academic Publishing und abm Inc.“

Die quantitative Genanalyse wurde mit der Standardmethode der Cyber green Realtime-PCR durchgeführt. Dieses interkaliert mit der doppelsträngigen DNA und ist proportional zu der Menge des PCR-Produktes. Durch fortlaufende Messung der Fluoreszenz wurde es ermöglicht eine indirekte Aussage über die Menge der neu amplifizierten DNA zu treffen. Um jedoch die Werte zu quantifizieren, werden die *cycle threshold*-Werte (Ct-Werte) erfasst, bei welchen erstmalig die Fluoreszenz signifikant über der Hintergrundfluoreszenz angestiegen ist.

Zu der Überprüfung der korrekten Amplifikation erfolgte die Analyse der Schmelzkurve, die spezifisch für jedes Produkt ist. Unter optimalen Bedingungen sollte sich ein Temperaturpeak pro PCR-Produkt darstellen. Der Schmelzpunkt bei dem ein Peak entsteht hängt vom GC-Gehalt und der Länge des Produktes ab

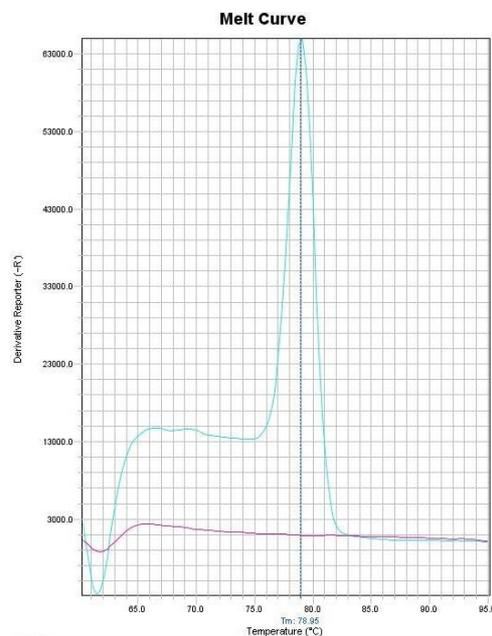


Abbildung 6: Schmelzkurve des PCR-Produktes (TRAP, H₂O) nach Realtime-PCR mit spezifischen TRAP-Primer.

Alle PCR-Läufe in dieser Promotionsarbeit wurden in demselben Realtime-PCR-Gerät durchgeführt. Zusammensetzung Realtime-PCR-Ansätze:

Tabelle 17: Zusammensetzung des Realtime-PCR-Ansatzes

Reagenz	Volumen
Cyber green	4,5 µl
H ₂ O dest.	2,5 µl
Primer sense 5 mM	1,0 µl
Primer antisense 5 mM	1,0 µl
cDNA-Lsg 200-600 ng	1,0 µl
Gesamtansatz	10 µl

Die Messungen beinhalteten jeweils einen Leerwert. Im ABI Step One plus Programm wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

Tabelle 18: One-Step-plus Programm-Einstellung

Zeit	Temperatur	Zyklen
20 Sekunden	95 °C	
3 Sekunden	95 °C	40
30 Sekunden	60 °C	40

Für die relative Quantifizierung der Realtime-PCR wurde der *cycle-threshold* (Ct-Wert) des untersuchten Gens in Bezug zum CT- Wert des *housekeeping*- Gens β -Actin gesetzt. Dies wird errechnet durch die Differenz des CT-Wertes des Zielgens minus CT-Wert des *housekeeping*- Gen Δ Ct nach folgender Formel (Livak und Schmittgen 2001):

$$Y=2^{-\Delta Ct}$$

Der errechnete Y-Wert gibt die quantitative Genexpression des Zielgens im Verhältnis zu β -Actin wieder.

2.2.13 Statistische Auswertung

Die Statistik wurde aufgrund der Normalverteilung der Proben mit einem unpaarigen t-Testverfahren sowie für Graphen mit mehr als 2 Balken mit der Varianzanalyse ANOVA (Post-hoc-Test Bonferroni) innerhalb des *GraphPad Prism 4* Programms durchgeführt. Der aus den Tests resultierende p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine zufällige Probe in dem beobachteten Bereich liegt. Bei Werten kleiner als 0,05 sind weniger als 5 % der Ergebnisse zufallsbedingt. Hier spricht man von statistischer Signifikanz. Ist der Wert unter 0,01 so ist von einer hohen Signifikanz auszugehen. Bei Werten unter 0,1 wird von einer Tendenz ausgegangen.

2.2.14 Toluidinblau-Färbung

Für die Resorptionsanalyse der differenzierten Osteoklasten wurden mehrere Versuchsansätze durchgeführt. Einer dieser Ansätze war die Resorptionsanalyse auf Dentinscheiben. Dafür wurden die Dentinscheiben mit Monozyten inkubiert, die sich im Verlauf zu Osteoklasten differenzierten durch die Applikation von RANKL und M-CSF. Mit Hilfe von Toluidinblau-Färbung sollte eine quantitative und qualitative Analyse der Resorptionslakunen auf den Dentinscheiben durchgeführt werden. In einer 24-Wellplatte wurde den Dentinscheiben Medium (s. o.) und Monozyten für 21 Tage zugegeben. Anschließend wurden die Dentinscheiben mit ca. 65 µl PBS gewaschen und 60 Sekunden mit 3 % 1 M Na-hypochlorit-Lösung behandelt. Nach weiteren drei Waschschrritten mit jeweils 65 µl PBS für ca. 30 Sekunden folgte eine Inkubation mit 0,0001 % Toluidinblau-Lösung für 2 Minuten. Darauf folgten erneut drei Waschschrritte mit PBS. Die Dentinscheiben wurden anschließend mit 0,01 % Toluidinblau-Lösung für 30 Sekunden behandelt. Im Anschluss folgten erneut drei Waschschrritte mit PBS. Die gefärbten Dentinscheiben sollten unter einem Lichtmikroskop mit einer 10-fachen Vergrößerung fotografiert und die quantitative Analyse mit dem Programm Axiovision erfolgen. Jedoch zeigte sich die Aufnahme von Fotos technisch nicht möglich, so dass dieser Versuch nicht ausgewertet werden konnte.

2.2.15 TRAP-Färbung

Nach 14 bis 21 Tagen Kultivierung der Monozyten wurde die osteoklastenspezifische Tartrat- resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung durchgeführt, um somit die Differenzierung von Monozyten zu reifen Osteoklasten optisch darzustellen. Dem Prinzip des Tests unterliegt der Einsatz von Naphthol AS-BI Phosphaten mit diazotiertem (Nitrosierung primärer Amine) Fast-Garnet GBC. Zellen, die dieser Mischung ausgesetzt sind, bilden einen unlöslich braunen Farbniederschlag. Nach Zugabe von Tartratpuffer zeigen tartrat-resistente Zellen mit ihrer sauren Phosphatase eine hydrolytische Aktivität, die zu einer Farbreaktion führt.

Die Materialien für diesen Versuch sind unter Punkt 2.1.5 angegeben.

Die Zellen für die TRAP-Färbung wurden zuerst mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Sekunden mit der Fixierlösung 2.1.5 behandelt. Nach der Fixierung wurde erneut ein Waschschrtritt mit PBS durchgeführt. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit der SLP-Lösung für 1 Stunde lichtgeschützt bei 37 °C. Nach einem weiteren Waschschrtritt mit destilliertem H₂O wurde für eine Minute mit Hämatoxylin gegengefärbt. Nach der Färbung mit Hämatoxylin wurden die 2 Wellplatten mit alkalischem Wasser mehrere Minuten

gespült und luftgetrocknet. Die anschließende Darstellung und Auswertung erfolgte qualitativ unter einem Lichtmikroskop.

2.2.16 Resorptionsassay-Kit 24

Die folgende Methodik wurde mit dem CSR-BRA-24 KIT von Hölzel Diagnostika (Köln) durchgeführt. Das Resorptionsassay-Kit ist eine Calciumphosphat beschichtete 24-Wellplatte mit der die Resorptionsaktivität der Osteoklasten bestimmt werden kann. Das beschichtete Calciumphosphat bindet zuerst an das Fluoresceinamine markierte Chondrotinsulfat welches von der Calciumphosphatschicht in das Medium von resorptionsaktiven Osteoklasten freigesetzt wird. Durch die Messung der Fluoreszenzintensität des konditionierten Mediums ist es möglich, eine Aussage über die Knochenresorptionsaktivität der Osteoklasten zu treffen.

Vorsichtig wurde das Medium von der Fluoresceinamin beschichteten Calciumphosphatplatte entfernt. In jedes Well wurden 1 ml Monozyten in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/ml hinzugegeben. Das Medium in dem die Zellen kultiviert wurden besteht aus MEM-alpha mit 10 % fetalem bovines Serum (FBS). Zu den Monozyten wurden pro Well 10 μ l RANKL und 2,5 μ l M-CSF hinzugefügt und ohne Mediumwechsel für 6 Tage kultiviert. Am Tag 6 wurden 100 μ l konditioniertes Medium von jedem Well auf die 96-Wellplatte übertragen. Jeweils 50 μ l vom Knochenresorptionsassay Puffer wurde in die Wells gegeben. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität bei 485 nm und 535 nm gemessen.

Für die Messung der degradierten Areale wurden die Zellen entfernt. Hierfür wurde nach der Zugabe von 5 % Natriumhypochlorid für insgesamt 5 Minuten die Platte mit H₂O gewaschen und luftgetrocknet. Unter einem Lichtmikroskop wurden Fotos erstellt und mit dem Image J Programm analysiert (siehe Abbildung 19).

2.2.17 Osteoklastenaktivitätsmessung mit 24er-Wellplatte

Für die Osteoklastenaktivitätsbestimmung in den 24-Wellplatten sowie Immunfärbung wurden die Zellen wie im Folgenden beschrieben fixiert.

Osteoklastenaktivitätsbestimmung in 24-Wellplatten: Das Medium der Zellen wurde vorsichtig abgesaugt und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils 500 µl pro Well 3 % Hypochlorid für 10 Minuten hinzugefügt. das Hypochlorid entfernt und erneut mit PBS gewaschen und mit H₂O im Kühlschrank aufbewahrt.

Immunfärbung: Die 2-Well *chamber slides* wurden zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit 70 % igem kalten Ethanol für 10 Minuten behandelt. Nach einem erneuten Waschvorgang werden die Zellen für die weitere Färbung mit PBS + 87 % igem Glycerol im Verhältnis 1:1 eingefroren.

Die Osteoklastenaktivität sollte anhand der Saos-2-Zellen-Matrix bestimmt werden. Diesbezüglich wurde quantitativ die von den Osteoklasten degradierte Fläche auf der Matrix bestimmt.

Die aus *buffy coat* isolierten Monozyten, welche durch Zugabe von M-CSF und RANKL zu reifen Osteoklasten in den 24-Wellplatten auf der Saos-2-Matrix differenzierten, wurden für die quantitative Auswertung, wie oben beschrieben, zuerst fixiert. Für die Sichtbarkeit der degradierten Bereiche wurden die Flächen gefärbt. Diesbezüglich wurden die fixierten Zellen zuerst mit Wasser gewaschen und mit NH₄OH für 30 Minuten behandelt. Nach zwei weiteren Waschsritten mit Wasser wurden den Flächen für 1 Stunde 1 % Silbernitratlösung hinzugefügt und zum Schluss für 2 Minuten mit 1 % Pyrogallol behandelt. Die Flächen auf den Wells wurden schließlich luftgetrocknet.

Unter dem Lichtmikroskop wurden jeweils fünf identische Bereiche in einem Well fotografiert und mit dem Programm Image J durch Bildung eines Mittelwertes ausgewertet.



Abbildung 7: Schematische Darstellung der fotografierten Bereiche

2.2.18 Immunfärbung

Für die Immunfärbung mit Antikörpern wurden die Zellen zuerst mit 70 %i gem kalten Ethanol fixiert. Auf diesen Schritt folgten drei Waschung der Zellen mit PBS für je zwei Minuten. Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde in einer feuchten Dunkelkammer mit der oben beschriebenen Blockierlösung behandelt. Nachfolgend wurden erneut zwei Waschungen mit PBS durchgeführt. Nach dem Waschvorgang wurde jedes Well mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1:500) für 24 Stunden bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Als Kontrolle diente ein Einsatz ohne primären Antikörper. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Zellen in beiden Wells erneut dreimal gewaschen und mit dem zweiten Antikörper AlexFluor 448 rabbit antigoat (1:200) behandelt. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper betrug 1 Stunde. Nachfolgend wurden die Zellen zweimal je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Das zuvor angesetzte DAPI (2 ml H₂O dest. + 2 µl DAPI), welches für die Kernfärbung benötigt wird, wurde nun zu den beiden Wells gegeben und 5 Minuten in der Dunkelkammer belassen. Zum Schluss wurden die Zellen zuerst in PBS und anschließend mit H₂O dest. gespült und luftgetrocknet.

Die gefärbten Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht und fotografiert (Abbildung 18).

2.2.19 Western Blot

Für die Ablösung der Zellen für die Proteinbestimmung wurden jeweils 100 µl Proteinlysepuffer bei einer Temperatur von 60 °C verwendet. Anschließend für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Im nächsten Schritt erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm. Anschließend wurde der Überstand für die Proteinbestimmung verwendet.

Vor der Proteinkonzentrationsbestimmung wurde eine Standardkurve mit bovinem Serumalbumin erstellt. Die Ausgangskonzentration der Standardlösung betrug 1 µg/µl. Aus diesem wurde eine Verdünnungsreihe mit destilliertem Wasser und einem Verdünnungskoeffizient 1:2 erstellt, die jeweils aus sechs Standardproben à 50 µl bestand. Gleichzeitig wurden die isolierten Proteine aus der Zellkultur in einem Verhältnis 1:5 mit H₂O verdünnt. Nun wurde das BCA-Protein-Assay-Reagent A und -Reagent B im Verhältnis 50:1 vermischt und jeweils 950 µl mit 50 µl der verdünnten Proteinlösung vermengt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Proben und die Standardlösungen am Eppendorf Bio Photometer bei einer Wellenlänge von 562 gemessen.

Jegliche Proteinvorbereitung erfolgte auf Eis. Jede Probe wurde jeweils mit 8 µl NuPage LDS Sample Puffer und Mercaptoethanol in einem Verhältnis von 1:10 aufgetragen. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben auf 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Hierdurch wurde die Denaturierung der Proteine gewährleistet. Anschließend wurden die Proben erneut sofort auf Eis gestellt.

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde die Gelelektrophorese als Standardverfahren benutzt. Hierzu wurden anhand der Arbeitsanleitung des Herstellers das NuPage Gel verwendet. In jede Tasche wurde ca. 22 µl Probe oder 5 µl Rainbow Marker vorsichtig pipettiert. Daraufaufgehend durchliefen die Proben das Gel zuerst bei 120 Volt für ca. eine Stunde das Sammelgel und anschließend nochmal für ca. eine Stunde bei 100 Volt das Trenngel.

Nach vollständiger Trennung der Proteine auf dem Gel folgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Hierfür wurde das Gel direkt auf die Membran gelegt und senkrecht zu der Laufrichtung eine elektrische Spannung von 30 Volt für einen Zeitraum von ca. zwei Stunden angelegt. Mit einem spezifischen Antikörper können nun die „geblotteten“ Banden detektiert werden. Zuvor wurde der Western Blot mit einer unspezifischen Färbung (Ponceau S) gegen alle Proteinbanden überprüft. Der Konstruktionsaufbau des Western Blots wurde nach der Arbeitsanleitung der Firma Invitrogen durchgeführt.

Zu der Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurde die Membran nach erfolgreichem Transfer mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T Lösung für 1 Stunde geblockt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit Primärantikörper (1:100 in 5 %- Milch-TBS-T-Lösung) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran zuerst zweimal kurz mit PBS und anschließend für 10 Minuten weitere zweimal in 5 %-Milch-TBS-T gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurde der im Verhältnis von 1:2000 verdünnte Sekundärantikörper in 2,5 %-Milch-TBS-T-Lösung hinzugegeben. Die Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch belassen. Darauf folgten erneute Waschschrte mit zweimal PBS und dreimal 10 Minuten mit 5 %-Milch-TBS-T.

Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte mit Western Lightning® Plus ECL von Perkin Elmer. 1 ml der Detektionslösung A wurde mit 25 µl der Detektionslösung B vermischt und auf die Membran pipettiert. Nach einer Minute wurde die Lösung entfernt und die Banden durch Intas ECL Chemocam Imager sichtbar gemacht.

3 Ergebnisse

3.1 Monozytenisolation und Osteogene Differenzierung

Die Monozytenisolation und die anschließende Differenzierung mit unterschiedlichen Mediatoren (u. a. Zytokine, Osteoblastenüberstand) wurden in neun Versuchen durchgeführt. Aufgrund des unterschiedlichen Ausgangsmaterials, (*buffy coat* von unterschiedlichen Spendern) war es notwendig, die Versuche mehrmals zu wiederholen, um somit die Evidenz der Ergebnisse zu erhöhen. Im Folgenden sollen die Versuchsergebnisse dargestellt und die identischen Versuche verglichen werden. Die unter dem Kapitel Methodik angegebenen Techniken wurden für alle Versuche gleich durchgeführt. Zwei Versuche wurden aufgrund schlechter Evidenz nicht gewertet. Die ersten vier Versuche (nummeriert mit 1 bis 4) dienten der Bestimmung der optimalen Zeitdauer der Kultivierung, der Zellzahl, dem Zeitpunkt der Stimulierung sowie der Konzentrationsbestimmung der Osteoklasteninduktoren RANKL und M-CSF. Nach der Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen mit Zellzahl, Kultivierungsdauer, Zytokinstimulationszeitpunkt etc. (siehe Tabelle 20 Seite 42) war das System der Osteoklastendifferenzierung durch drei identische Versuche (A,B,C) etabliert.

3.1.1 Osteoklastendifferenzierung

Die Kultivierung der Osteoklasten aus Monozyten erfolgte unter der Zugabe von RANKL und M-CSF in einem Zeitraum von 14 bis 22 Tagen, abhängig vom Versuchsaufbau.

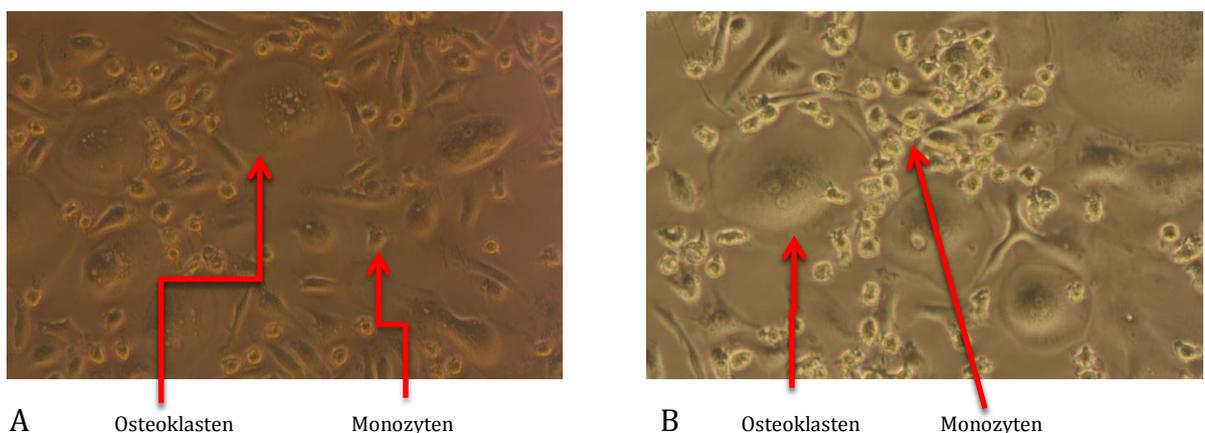


Abbildung 8: Isolierte Monozyten in einer 6-Wellplatte aus dem Versuch Nr. 1, die mit Zugabe von M-CSF und RANKL zu mehrkernigen Osteoklasten differenzieren. Abbildung A: Tag 8 nach der Isolation und Abbildung B: Tag 11. 100xfache Vergrößerung.

Nach erfolgreicher Monozytenisolation und der Differenzierung zu reifen Osteoklasten, wurde die Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenproteine TRAP, Cathepsin K, VNRT und MMP9 im Vergleich zu den undifferenzierten SCP-1-Zellen analysiert. Auf dem Foto sind mehrere mehrkernige Osteoklasten sowie teils undifferenzierte Monozyten zu sehen.

Genexpression der spezifischen Osteoklastenproteine

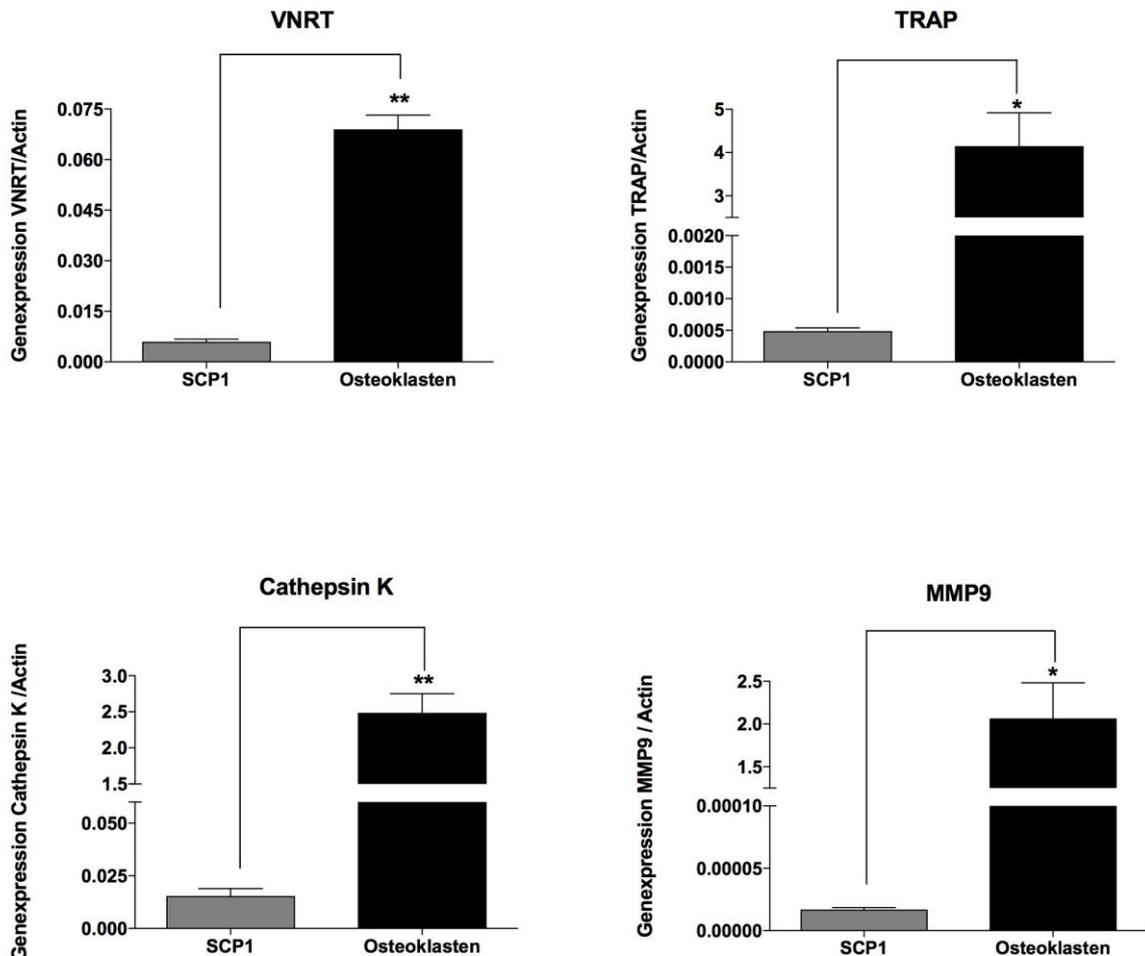


Abbildung 9: Genexpression von den osteoklastenspezifischen Oberflächenproteinen im Vergleich zu der SCP-1-Zelllinie. Die Genexpression an Tag 14 der osteoklastenspezifischen Oberflächenmarker VNRT (p-value < 0,01), TRAP (p-value < 0,05), Cathepsin K (p-value < 0,01) und MMP9 (p-value < 0,05) liegen alle im signifikanten Bereich (n=3).

Durch die optische Darstellung der mehrkernigen Osteoklasten und der Genanalyse der osteoklastenspezifischen Oberflächenproteine konnte die erfolgreiche Differenzierung von isolierten Monozyten zu reifen Osteoklasten verifiziert werden. Der signifikante Unterschied der Expression der osteoklastenspezifischen Oberflächenproteine im Vergleich zu den SCP-1-Zellen ist ein sicherer Beweis für die erfolgreiche Differenzierung.

3.1.2 Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen

Für die Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen (Zellzahl, Kultivierungszeit, Konzentration von M-CSF und RANKL, Zytokinstimulationszeitpunkt) wurden vier Versuche unter gleichen Standardbedingungen (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank sowie Medium wie in 2.2.3. angegeben) mit unterschiedlichen Versuchsansätzen durchgeführt und neben der optischen Kontrolle die Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenproteine bestimmt. Hierfür wurden unterschiedliche Zeitpunkte der RNA-Isolierung, der Zellzahl pro Well, der Zeitpunkt der Zytokinstimulation sowie unterschiedliche RANKL/M-CSF Konzentrationen gewählt.

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
RNA-Isolierung	21 d	22 d	20 d	17 d
Zellzahl pro Well	800.000	800.000	800.000	1.000.000
Zytokinstimulation	11 d, 14 d, 18 d	14 d, 17 d, 20 d	13 d, 16 d, 19 d	10 d, 13 d
Osteoblastenüberstand	---	---	13 d, 16 d	10 d, 13 d
Mediumwechsel	1 ml	1 ml	1 ml	3 d: 2 ml; ansonsten 1 ml
RANKL/M-CSF	10 µl/2,5 µl	10 µl/2,5 µl	3 d: 10 µl/2,5 µl 6 d: 5 µl/1,25 µl	5 µl/1,25 µl

Tabelle 19: Dargestellt sind die Unterschiede der Versuchsabläufe zu der Bestimmung der optimalen Bedingungen für Gewinnung von Osteoklasten.

In den Versuchen drei und vier wurden zusätzlich der Effekt der Osteoblastenüberstände untersucht. Für die optimale Versuchsbedingungen wurde auch hier der Zeitpunkt der Stimulation mit den Überständen variiert. Zu sehen ist die optische Abnahme der Anzahl der reifen mehrkernigen Osteoklasten ab dem Tag 13 bei Verwendung der Überstände.

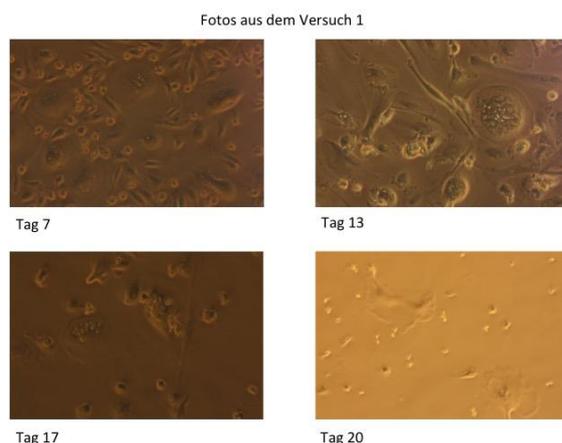


Abbildung 10: Fotos aus dem Versuch 1. Monozytendifferenzierung zu Osteoklasten an den Tagen 7, 13, 17 und 20 in 10-facher Vergrößerung.

Beispielhaft ist in der nächsten Abbildung die Genexpression der Osteoklastenmarker TRAP und VNRT aufgeführt. Hierbei sieht man, dass die Tendenz der Versuche 2 bis 4 in eine Richtung zeigt, wobei beim Versuch 1 dieses genau das Gegenteil ergeben hat. Der Zeitpunkt der RNA-Isolierungen bei allen jeweiligen Versuchen wurden an Tag 21 (Versuch 1), Tag 22 (Versuch 2), Tag 20 (Versuch 3) und Tag 17 (Versuch 4) gemäß Tabelle 19 durchgeführt.

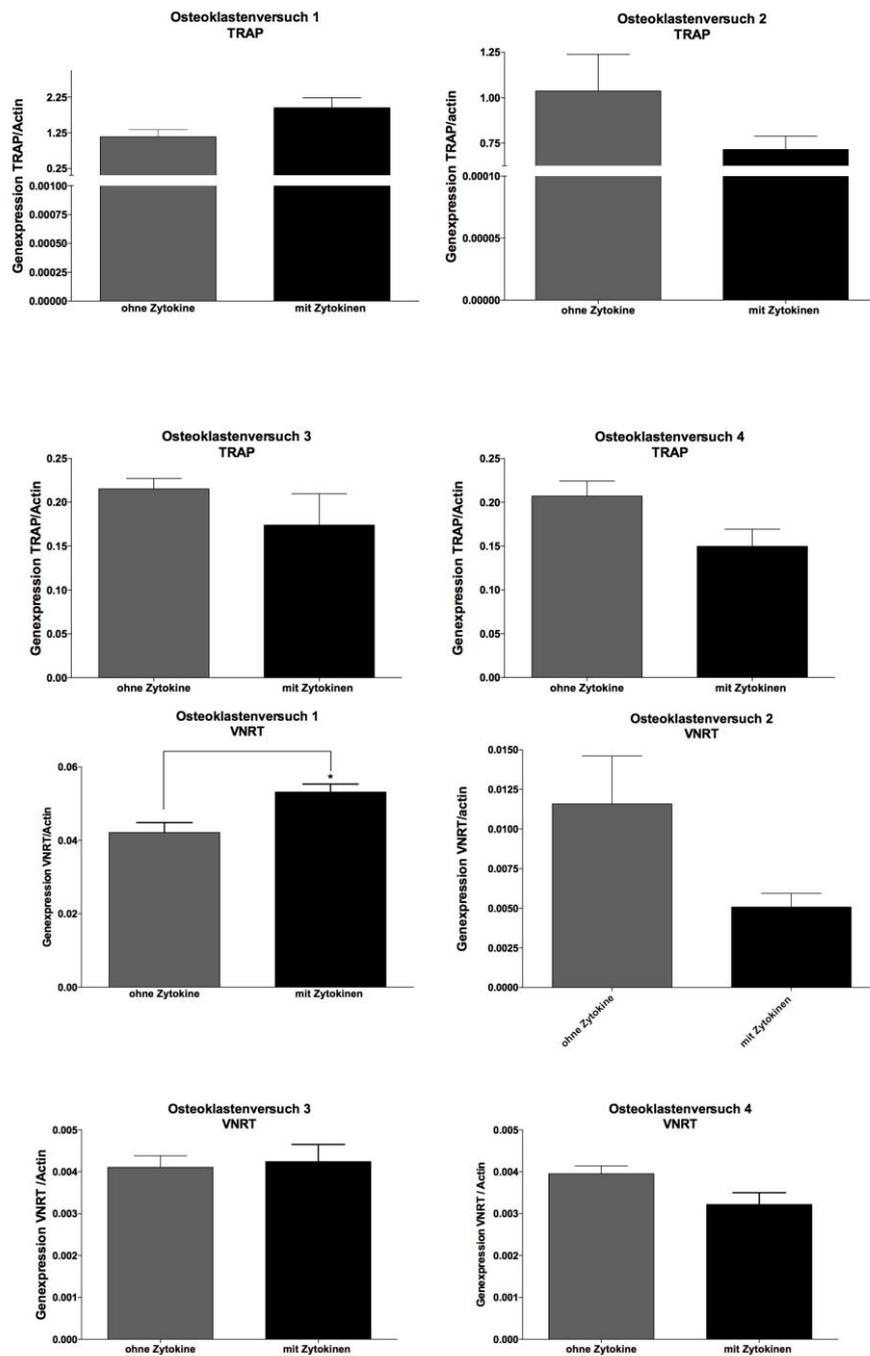


Abbildung 11: Dargestellt sind die Genexpression von TRAP und VNRT in allen 4 Versuchen (n=6) V1 bis V4 nach 17 bis 22 Tagen).

Durch die einerseits optische Darstellung in Abbildung 10 sowie die Genexpressionsanalyse in Abbildung 11 wurde für die optimalen Versuchsbedingungen folgende Konstellation ausgewählt:

	Optimale Versuchsbedingungen
RNA-Isolierung	14 d
Zellzahl pro Well	1.000.000
Zytokinstimulation	7 d, 9 d, 12 d
Mediumwechsel	2 d: 2ml, ab 5 d: 1 ml
RANKL/M-CSF	10 μ l/2,5 μ l

Tabelle 20: Dargestellt sind die aus den Vorexperimenten ermittelten optimalen Versuchsbedingungen während der Kultivierung der Monozyten.

3.1.3 Zytokineffekt auf die Differenzierung von Osteoklasten

Isolierte Monozyten wurden mit der Zytokinkombination (IL-1 β , IL-6, TNF- α (Tab. 19; s. S 40)), in Gegenwart von MCSF und RANKL behandelt und die Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenmarker bestimmt.

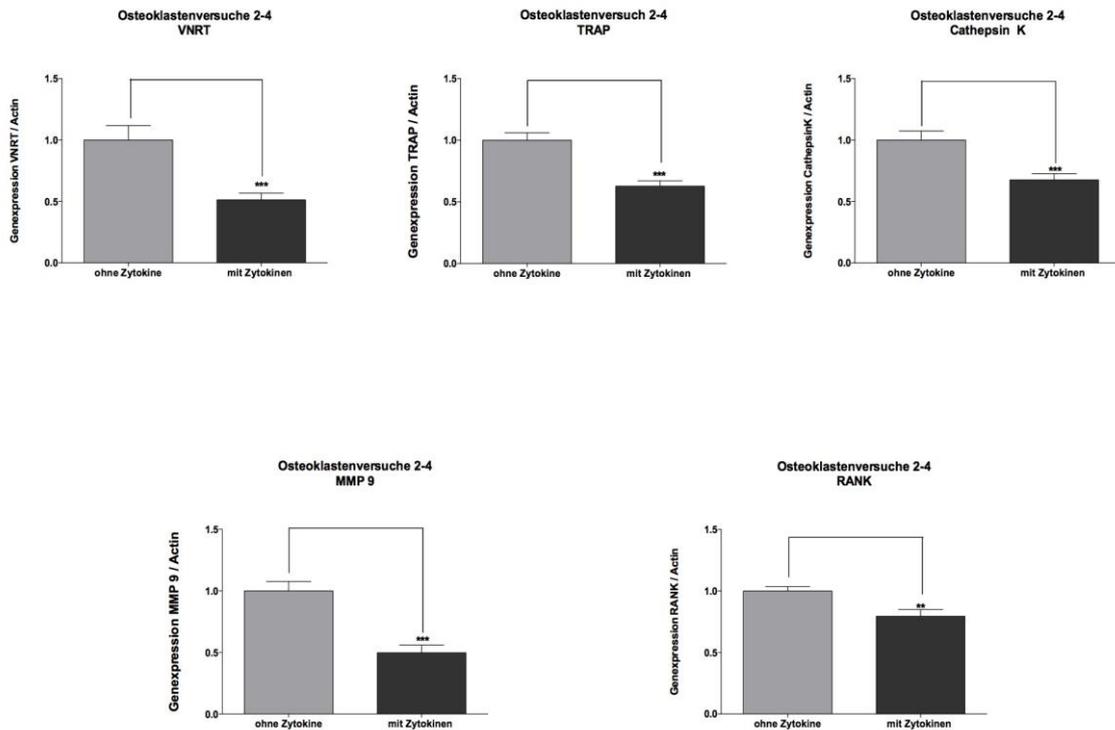


Abbildung 12: Dargestellt ist die normalisierte Genexpression von TRAP, Cathepsin K, VNRT, MMP9, RANK bei Behandlung der Zellen mit der Zytokinkombination im Vergleich zu unbehandelten Zellen aus den Versuchen 2 bis 4 (t=17 bis 22Tage). (**p-value <0,001; ***p-value <0,0001; VNRT ***p-value 0,0004; Cathepsin K ***p-value 0,0009) (n=6)

Hier wurden die Versuche 2 bis 4 normiert und der Versuch 1 nicht mit einbezogen, da die Ergebnisse aus dem ersten Versuch eine umgekehrte Tendenz zeigten. Der Grund hierfür sind wahrscheinlich unter anderem die lange Kultivierzeit sowie die eingesetzte Menge der Zellen und auch eventuell das Spendermaterial. In der Abbildung zeigte sich eine Abnahme der TRAP, Cathepsin K, MMP9, VNRT und RANK Expression in Gegenwart der Zytokine im Vergleich zu der Kontrolle ohne Zytokine. Somit zeigt sich eine direkte Hemmung der Osteoklastenaktivierung durch die Zytokinkombination.

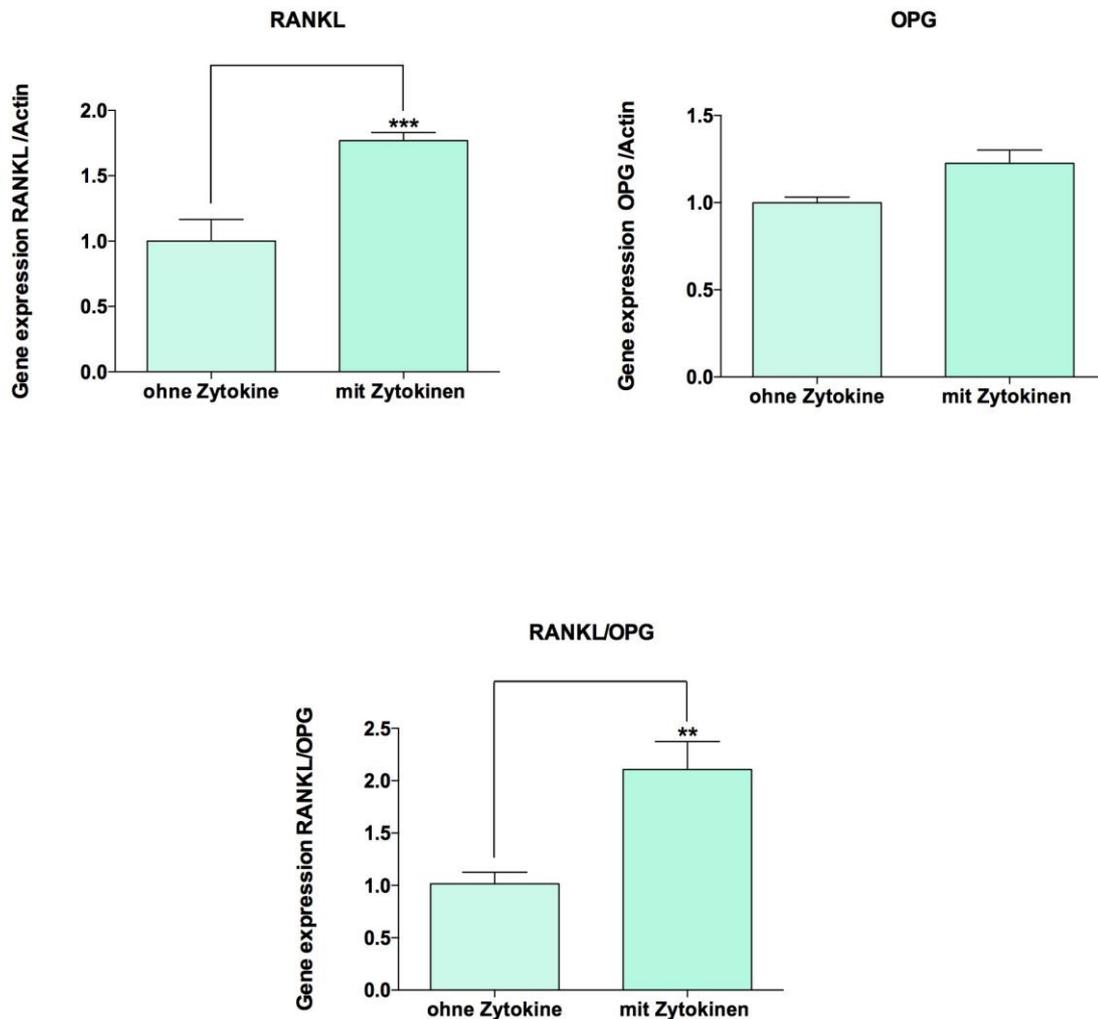
3.1.4 Genexpression von RANKL und OPG in Osteoblasten

Abbildung 13: Dargestellt ist die Genexpression von RANKL und OPG in Osteoblasten im Vergleich Osteoblasten ohne jegliche Behandlung, Osteoblasten mit Zytokinbehandlung (T= 17 bis 22 Tage). Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der RANKL Expression und des RANKL/OPG Quotienten. **P-value <0,01, ***P-value= < 0,0001 (n=22).

Besonders wichtig ist auch die Interaktion von Osteoblasten und Osteoklasten. Durch die Behandlung der Osteoblasten mit der Zytokinkombination IL-1 β , IL-6 und TNF- α zeigte sich eine deutliche signifikante Erhöhung des Osteoklasteninduktors RANKL, dessen Rezeptor RANK auf den Osteoklasten exprimiert wird. Da es zu keiner Erhöhung von OPG kam, führte dieses auch zu einer Verschiebung des Gleichgewichts RANKL/OPG zu Gunsten von RANKL. Die hemmende Wirkung auf die Differenzierung der Osteoklasten durch OPG wurde somit erniedrigt. Der Zusammenhang von Osteoblasten-Osteoklasten Interaktion konnte somit verdeutlicht werden.

3.1.5 Effekt der Überstände auf die Differenzierung von Osteoklasten

In der gleichen Versuchsreihe wurde neben dem Effekt der Zytokinkombination auch die Wirkung von Osteoblastenüberständen (SCP-1-Zellen), untersucht. Die Osteoblasten wurden ihrerseits mit der identischen Zytokinkombination für 48 Stunden inkubiert. Nach 48h wurde der Zellüberstand dieser osteoblastären Zellen asserviert und zu den Osteoklasten während ihrer Differenzierung hinzugefügt.

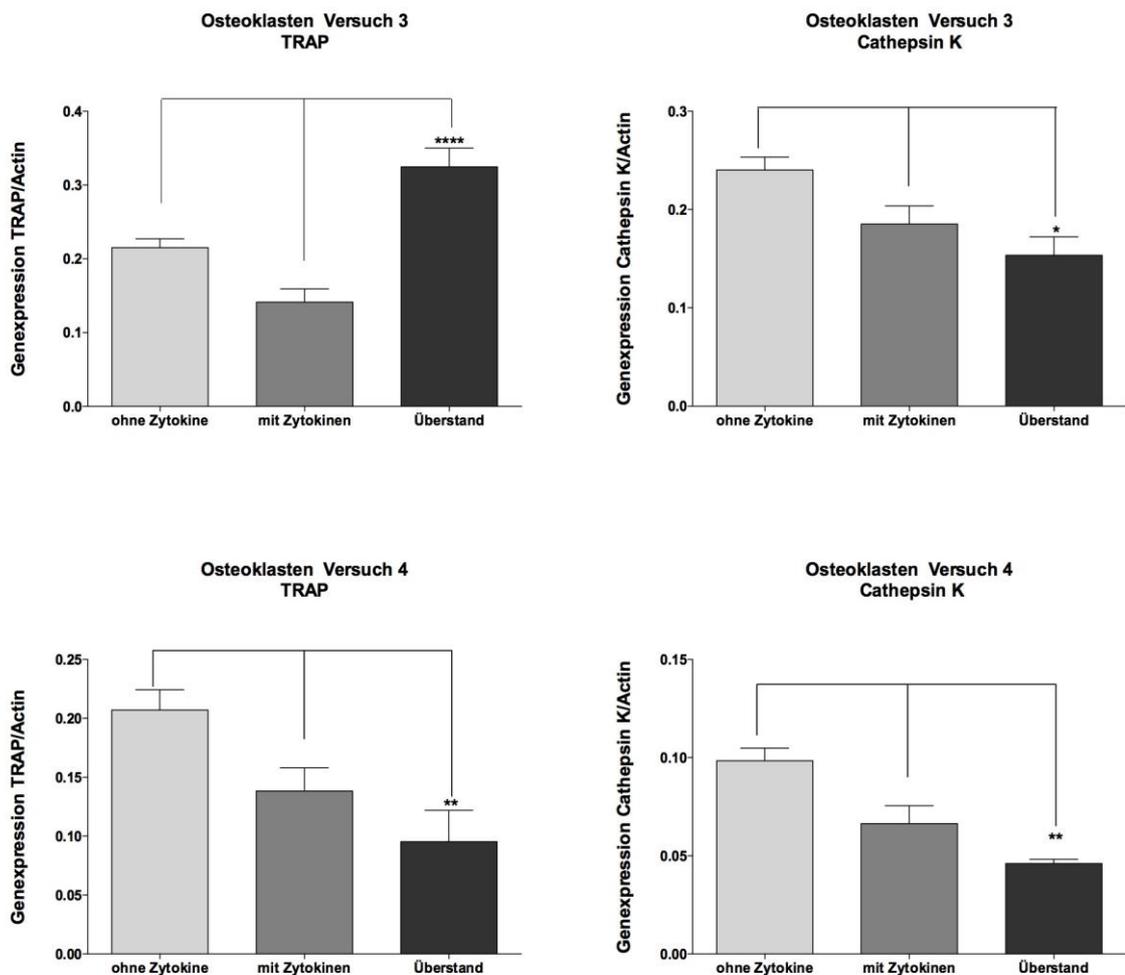


Abbildung 14: Genexpression der Überstände im Vergleich zu Zellen, die mit der Zytokinkombination behandelt wurden, sowie unbehandelte Osteoklasten (T=17 bis 20 Tage). Anova (post-hoc-test Bonferroni) *p-value <0.05; **p-value <0.01 ****p-value <0,0001 (für ohne Zytokine und mit Zytokinen n=6, für die Überstände n=3).

Es zeigt sich eine signifikante Erniedrigung der Cathepsin K- und TRAP-Expression, die vor allem durch die Inkubation mit den SCP-1-Überständen deutlich an Signifikanz zunimmt. Beim dritten Versuch konnte bei TRAP keine signifikante Abnahme gezeigt werden, sondern eher eine Erhöhung der Expression von TRAP durch die Überstände.

3.1.6 Vergleich der Genexpression von Überständen vs. inkubierten Zytokinen

Als Negativkontrolle zu der Inkubation mit SCP-1-Zellüberstände wurden die Monozyten mit einer Zytokinkombination inkubiert, die zuvor für 48h im Brutschrank inkubiert wurde. Somit war die Voraussetzung gegeben, dass nicht die Zytokine selbst einen Effekt auf die Osteoklastendifferenzierung hatten, sondern die von den Osteoblasten ins Medium abgegebenen Mediatoren.

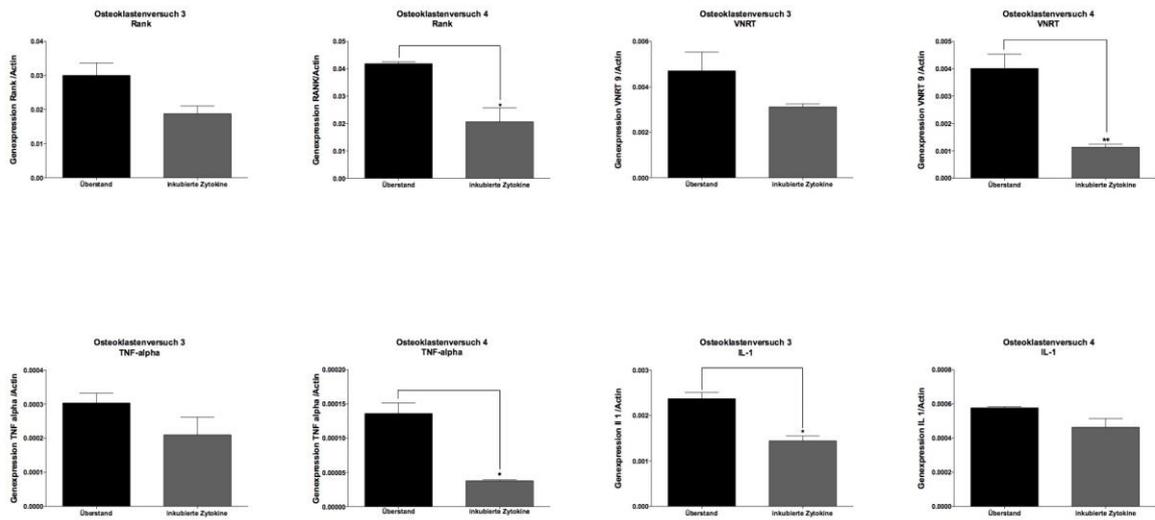


Abbildung 15: Genexpression von Rank, VNRT, TNF- α und IL-1 β in Osteoklasten, die mit SCP-1-Zellkulturüberständen oder mit 48h inkubierten Zytokinen inkubiert wurden (T=17 bis 20 Tage). (*p-value <0.05; **p-value <0.0001) (n=3).

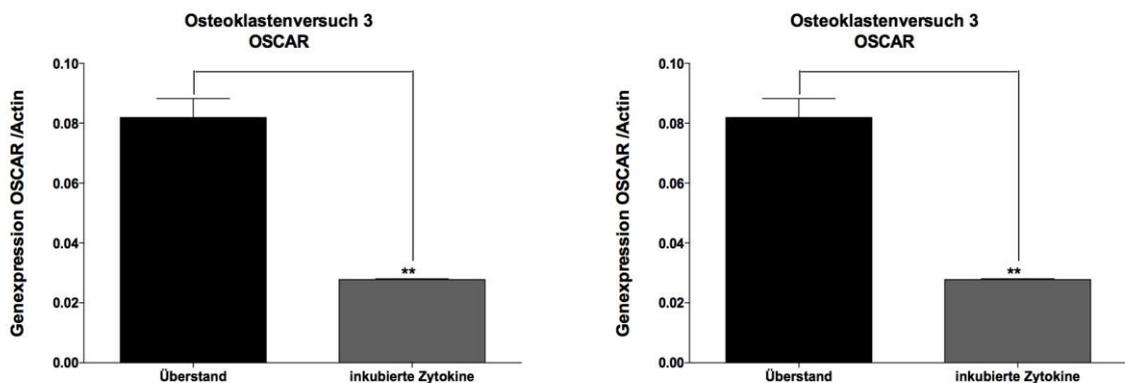


Abbildung 16: Genexpression von OSCAR in Osteoklasten, die mit SCP-1-Zellkulturüberständen oder inkubierten Zytokinen (T=20 Tage). (*p-value <0.05; **p-value <0.0001) (n=3).

Durch den Vergleich der Versuchsansätze die mit Überständen behandelt wurden konnte im Versuch 4 eindeutig gezeigt werden, dass die Zytokinkombination nicht nur einen direkten, sondern auch einen indirekten Effekt über die Osteoblasten – Osteoklasten Interaktion auf die Osteoklastendifferenzierung ausüben. Im Versuch 3 zeigte sich allerdings nur eine Tendenz in gleiche Richtung, so dass hier nur von einer Hypothese auszugehen ist und für weitere Evidenz mehrere Versuchsansätze notwendig sind, die in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

3.2 TRAP-Färbung

Neben der quantitativen Analyse der Genexpression wurde eine zytochemische Färbung der Osteoklasten durchgeführt. Hierfür wurde die Färbung des osteoklastentypischen Proteins Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) verwendet.

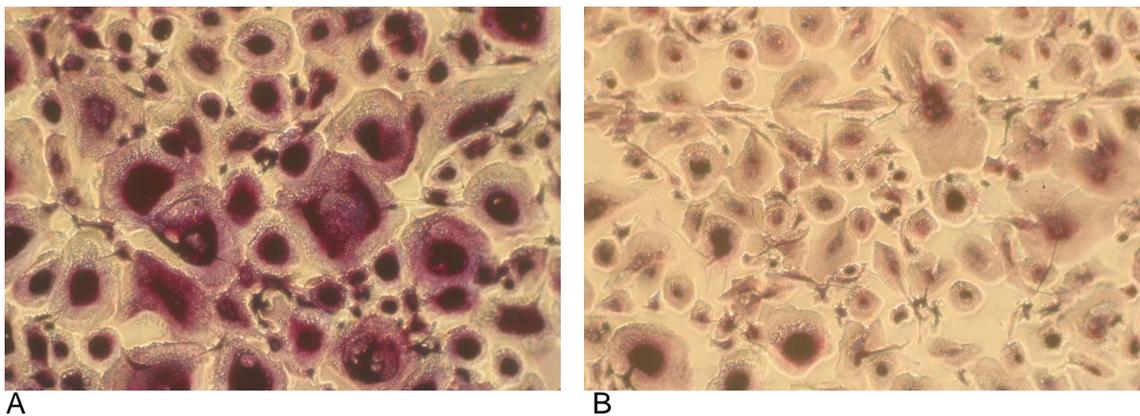


Abbildung 17: Die Abbildung A: TRAP-Färbung von TRAP-positiven Osteoklasten am 14. Tag. Abbildung B: ohne TRAP-Färbung am Tag 24 mit Hämatoxylin-Färbung.

Die TRAP-Färbung verblasst nach einigen Tagen. Bei einer Expression von TRAP reagiert der Osteoklast mit dem Tartratpuffer, welcher sich in einer Farbreaktion widerspiegelt. In diesem Fall werden die Zellkerne blau-violett gefärbt (siehe Abbildung A). Die Expression von TRAP korreliert mit der Anzahl der Osteoklasten und kann für die Bestimmung herangezogen werden (Ballanti et al. 1997).

3.3 Mikroskopische Fluoreszenzbestimmung von VNRT auf Osteoklasten

Zusätzlich wurde zu der quantitativen Analyse der Genexpression und zytochemischen Färbung mittels TRAP eine mikroskopische Fluoreszenzbestimmung von VNRT auf den Osteoklasten durchgeführt. Das Vitronektin als osteoklastenspezifisches Oberflächenprotein enthält eine RGD-Folge, welche eine Bindungsmöglichkeit für membrangebundene Integrine (Integrin alpha-V) darstellt (Schvartz et al. 1999). Durch die Zugabe von Integrin alpha-V-AK und Zugabe eines zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörpers konnten die Osteoklasten mittels Immunfärbung dargestellt werden. Die Fotos entstammen aus dem Versuch 1. Tag 5.

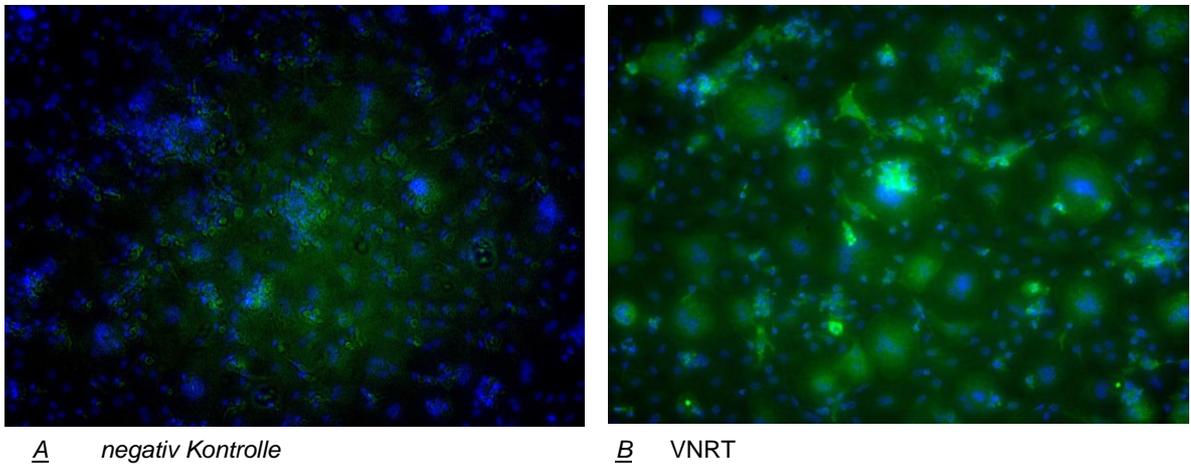


Abbildung 18: Abbildung A: Negativkontrolle (ohne Zugabe des primären Antikörpers gegen VNTR) des Osteoklasten. Abbildung B: Fluoreszenz nach Antikörperbindung in Gegenwart des primären antikörpers gegen VNTR.

3.4 Resorptionsanalyse

Neben der osteoklastenspezifischen Genexpression mittels TRAP und damit dem Rückschluss auf die Anzahl der Osteoklasten war auch die quantitative Resorptionsanalyse ein wichtiger Gesichtspunkt als Parameter der Osteoklastenaktivität. Für diese Zwecke wurden drei unterschiedliche Versuchsansätze durchgeführt.

1. Bestimmung der Resorption auf Dentinscheiben
2. Resorptionsassay-Kit
3. 24-Well-Resorptionsplatte

3.4.1 Bestimmung der Resorption auf Dentinscheiben

Die aus der *buffy coat*-Isolation gewonnenen Monozyten wurden unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu reifen Osteoklasten differenziert. Auf jede Dentinscheibe wurden jeweils 430.000 Zellen in 300 µl Medium hinzugegeben. Das Material wurde freundlicherweise von der Zahnklinik Göttingen zu der Verfügung gestellt. Eine Dentinscheibe wurde als Kontrolle ohne Zugabe von Zellen gewählt. Aufgrund von technischen Problemen war es nicht möglich, das Ergebnis auszuwerten. Auch mit einem Elektronenmikroskop konnte keine zufriedenstellende Aussage über die resorbierten Areale auf den Dentinscheiben gemacht werden. Daraufhin wurde dieser Versuch nicht mehr wiederholt.

3.4.2 Resorptionsassay-Kit 24

Das Resorptionsassay-Kit ist eine Calciumphosphat-beschichtete 24-Wellplatte mit der die Resorptionsaktivität der Osteoklasten bestimmt werden kann. Durch die Messung der Fluoreszenzintensität des konditionierten Mediums war es möglich eine Aussage über die Knochenresorptionsaktivität der Osteoklasten zu treffen.

Resorptionsassay-Kit 24 nach Entfernung der Zellen

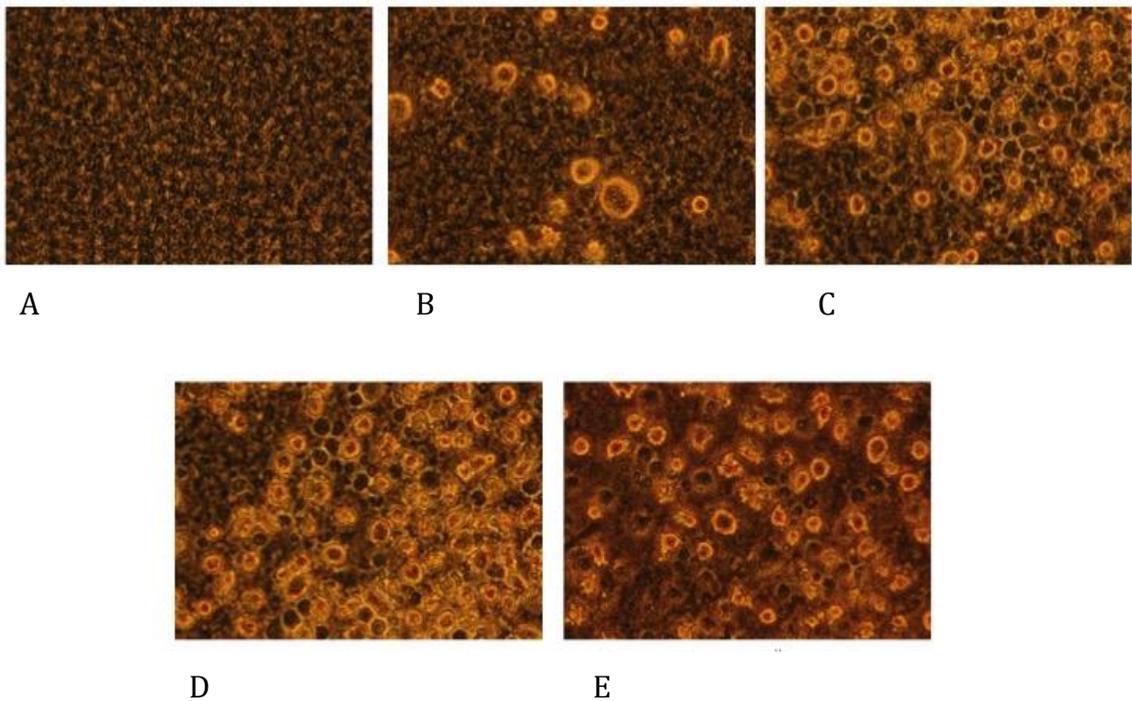
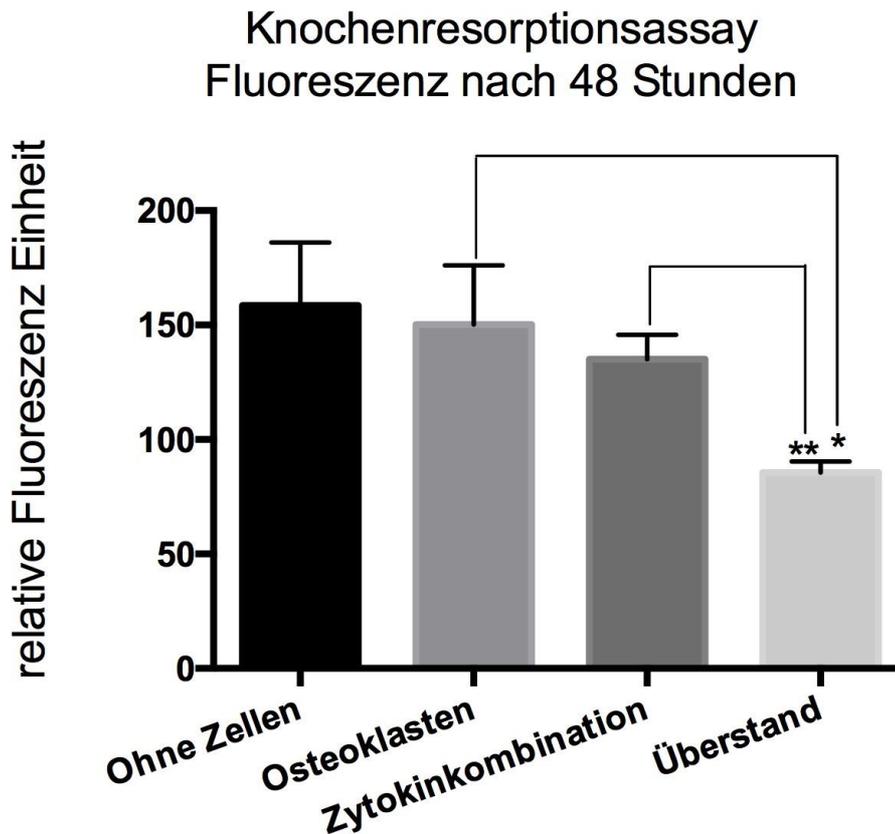


Abbildung 19: Resorptionsassay-Kit 24 nach Entfernung der Zellen (Osteoklasten wurden für 6 Tage auf der Matrix kultiviert). A: ohne Osteoklasten, B: mit Osteoklasten aber ohne RANKL und M-CSF, C: mit Osteoklasten und RANKL/M-CSF, D: Osteoklasten mit Zytokine und RANKL/M-CSF, E: Osteoklasten mit Überstand und RANKL/M-CSF.

Auf den Fotos in Abbildung 19 sind die resorbierten Bereiche durch die Osteoklasten auf der Resorptionsassay-Platte zu sehen. Die Resorption der Osteoklasten ist unter dem Effekt von RANKL und M-CSF deutlich. Die Zugabe von Zytokinen und Überständen jedoch zeigt in der optischen Kontrolle eine deutliche stärkere Resorptionsrate bei Zugabe von Zytokinen als bei Zugabe der Überstände. Im Folgenden wurden neben der optischen Kontrolle, nach Entfernung der Zellen, die resorbierten Areale mittels Fluoreszenz bestimmt.



Osteoklasten	-	+	+	+
RANKL/ M-CSF	-	+	+	+
Zytokine	-	-	+	-
Überstand	-	-	-	+

Abbildung 20: Dargestellt ist die Fluoreszenz auf dem Resorptionsassay Kit nach 48 Stunden am Tag 11. Die Osteoklasten wurden mit Zytokinen (IL-1, IL-6 und TNF-alpha), RANKL+M-CSF oder Überstand behandelt. *p-value 0.029; **p-value 0.004 (n=4).

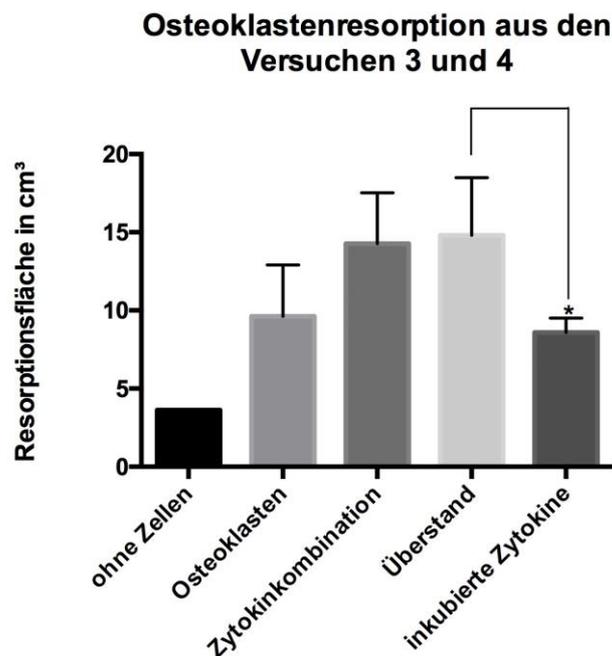
Die Auswertung der Resorptionsanalyse war nicht möglich, da die Positivkontrolle der Osteoklasten, welche mit M-CSF und RANKL behandelt wurden, keine erhöhte Fluoreszenz zeigten. Außerdem konnte anhand des Assays eine signifikante Abnahme der Fluoreszenz nach Behandlung der Osteoklasten mit Überstand im Vergleich zu Zellen ohne Behandlung bzw. mit Zytokinbehandlung dargestellt werden. Zu erwarten war jedoch eine Zunahme der Fluoreszenz bei einem zusätzlichen Effekt durch die Osteoklasten mit Überständen und grundsätzlich durch die Stimulation mit RANKL und MCSF

3.4.3 24-Well-Resorptionsplatte

Die dritte angewandte Methode für die quantitative Resorptionsanalyse der Osteoklasten war die 24-Well-Resorptionsplatte die uns freundlicher Weise von Frau Ute Hempel von der Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Institut für physikalische Chemie, TU Dresden bereitgestellt wurde. Die Matrix der 24-Wellplatten bestehen aus Saos-2-Zellen. Anhand der Resorptionsfläche durch die kultivierten Osteoklasten auf der Resorptionsplatte konnte eine Aussage über die Aktivität der Osteoklasten unter Stimulation von Zytokine bzw. Überstand getroffen werden (Lutter et al. 2010).

Jedes Well wurde mit 1 µl RANKL und 0,5 µl M-CSF behandelt. Dabei wurde pro Well je 100.000 Zellen in 2ml Medium kultiviert. Auf der Platte befanden sich jeweils 4-Well mit nur Zellen, Zellen mit Zytokinkombination, Zellen mit Überstand, Zellen mit Zytokinkombination die für 48 Stunden in Medium inkubiert wurden und die Kontrolle ohne Zellen.

Um eine Vergleichbarkeit zwischen dem Überstand, welcher 48 Stunden mit der SCP-1-Zelle behandelt wurde, zu erreichen, wurde die Zytokinkombination in 48-Stunden-Medium inkubiert. Somit waren die Ausgangsbedingungen identisch.



Osteoklasten	-	+	+	+	+
M-CSF+RANKL	-	+	+	+	+
Zytokine	-	-	+	-	-
Überstand	-	-	-	+	-
Inkubierte Zytokine	-	-	-	-	+

Abbildung 21: Dargestellt ist die Osteoklastenaktivität aus den Versuchen 3 und 4 (n=4).

Die Werte ergeben sich durch die Analyse wie unter 2.2.17 beschrieben.

Es zeigt sich eine signifikante Osteoklastenresorption mit einem p-value von 0,017 bei der Behandlung der Zellen mit Überständen im Vergleich zu ihrer Kontrolle (inkubierten Zytokinen). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch nicht im Vergleich mit unstimulierten Osteoklasten (nur mit M-CSF und RANKL) sowie bei der Zytokinkombination.

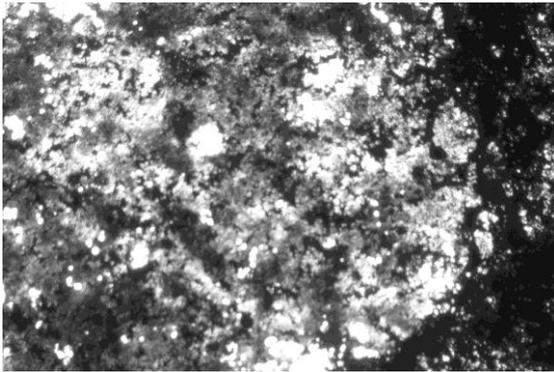


Abb.A

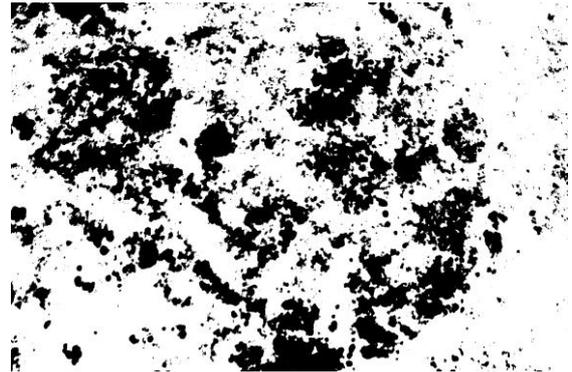


Abb.B

Abbildung 22: Abbildung A: Ausschnitt aus dem Resorptionsgebiet der Zellen mit Behandlung von osteoblastären Überständen an Tag 14, Abbildung B: Nur reine Resorptionsfläche (Negativ von Abbildung A) an Tag 14.

Osteoklastenresorption

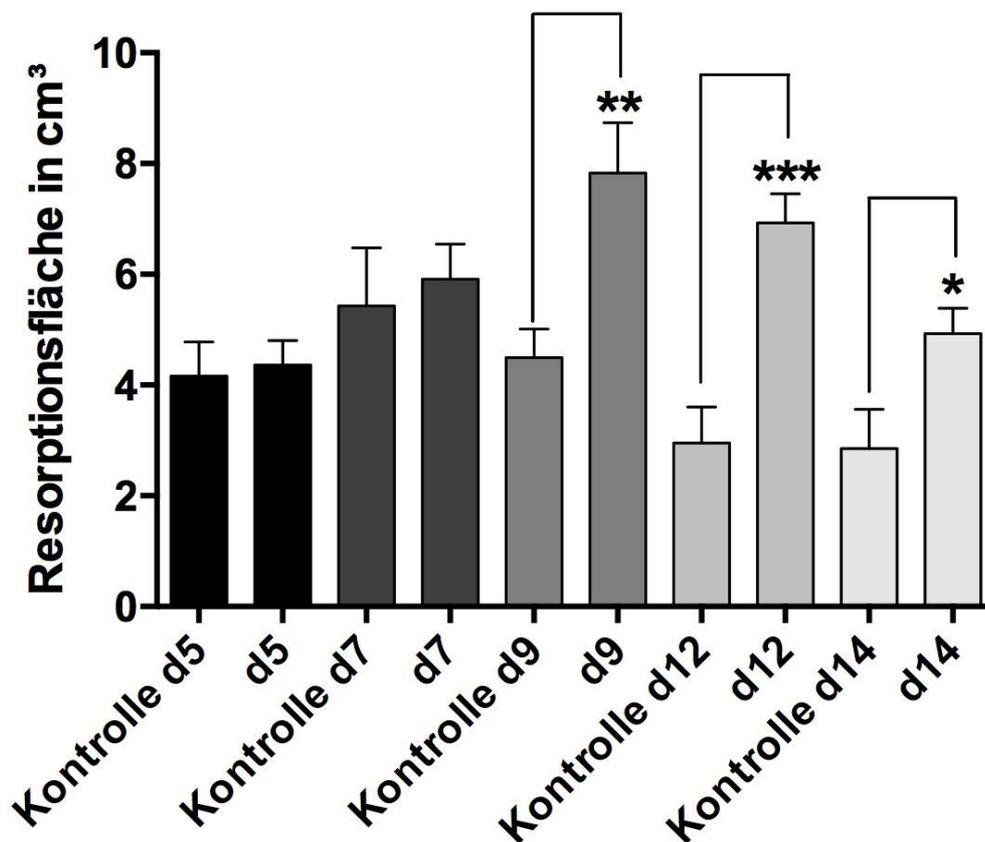
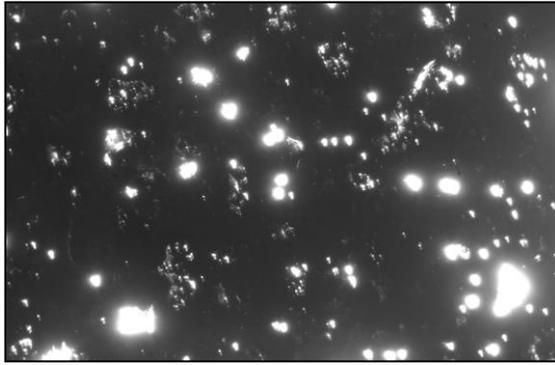
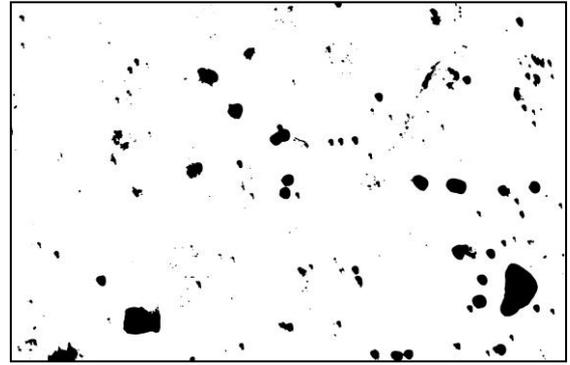


Abbildung 23: Die Abbildung zeigt die Osteoklastenresorption an den Tagen 5, 7, 9, 12 und 14 in Kontrolle (ohne Osteoklasten) sowie mit Osteoklasten die jeweils mit M-CSF und RANKL behandelt wurden (*p-value <0,05; **p-value 0.0028; ***p-value <0,0001) (n=19) aus den Etablierungsversuchen A, B, C.

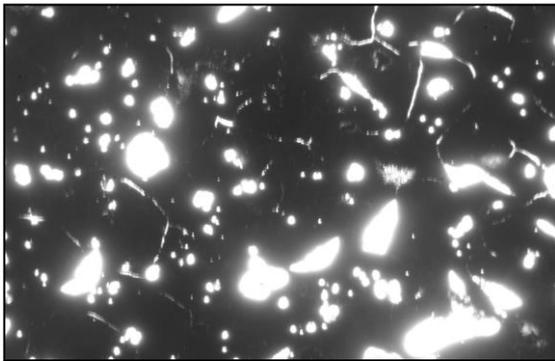
Aus den Ergebnissen der Resorptionsanalyse ist deutlich der Verlauf der Entwicklung der Monozyten zu Osteoklasten ab Tag sieben durch ihre Resorptionsaktivität nachweisbar. Hierbei steigt die Resorptionsaktivität an Tag 9 und 12 im Vergleich zu der Kontrolle signifikant am stärksten an. Jedoch ist hier auch ein Fehler durch die Streuung der Kontrollwerte zu berücksichtigen, so dass keine sichere Aussage über den zeitlichen Verlauf der Aktivität anhand dieser Messungen getroffen werden kann. Es zeigt sich eine gleichbleibende Osteoklastenaktivität an den Tagen 12 und 14 im Vergleich zu der Kontrolle. Die Abnahme der Resorptionsflächen an den Tagen 12 und 14 ist wahrscheinlich durch einen Messfehler zu erklären, da eine Zunahme der Saos-2-Matrix ausgeschlossen ist.



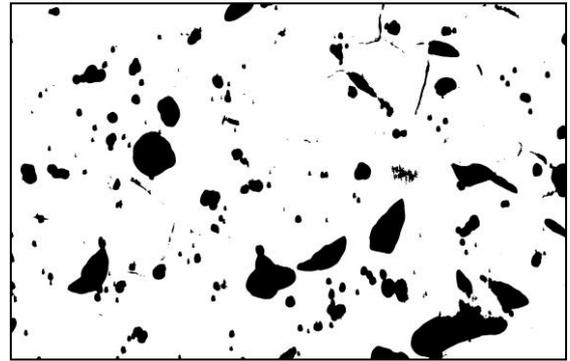
Tag 7



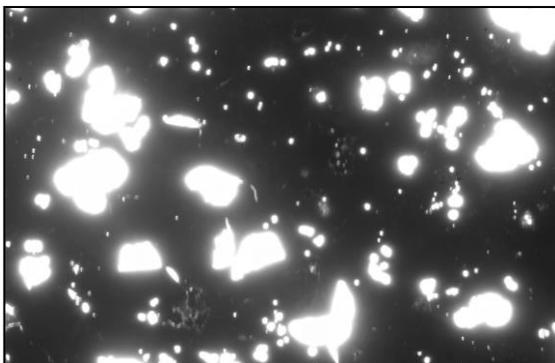
Tag 7



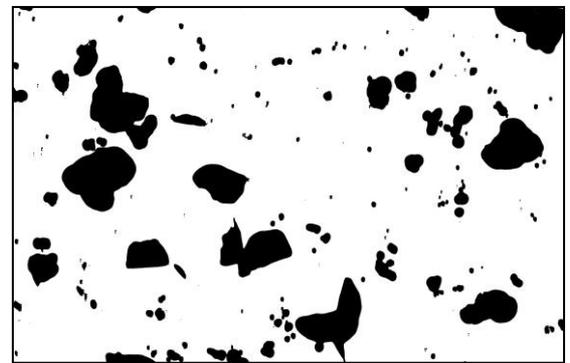
Tag 9



Tag 9



Tag 12



Tag 12

Abbildung 24: Abgebildet ist das Resorptionsgebiet an den Tagen 7, 9 und 12 aus den drei Etablierungsversuchen. Jeweils Fotos in nativ (links) und nach Bearbeitung mit dem Image J Programm mit nur Resorptionsfläche (negativ Foto rechts). Deutlich zu ersehen ist die qualitative Zunahme der Resorptionsfläche durch die Osteoklasten an Tag 12 im Vergleich zu den Tagen 7 und 9.

3.5 Western Blot

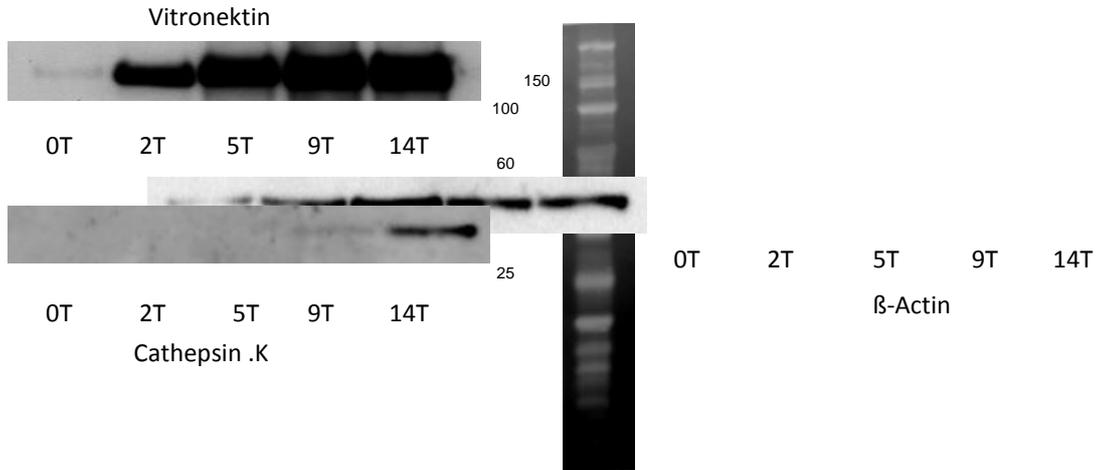


Abbildung 25: Western Blot von Integrin alpha-V (Vitronectin 140 bis 150 kDa, 1:100) sowie Cathepsin K (santa cruz 39 kDa, 1:50) an den Tagen 0, 2, 5, 9 und 14 aus dem Versuch C. Zu der Kontrolle dient das *housekeeping*-Gen β -Actin, welches sich bei der 42 kDa-Bande darstellte.

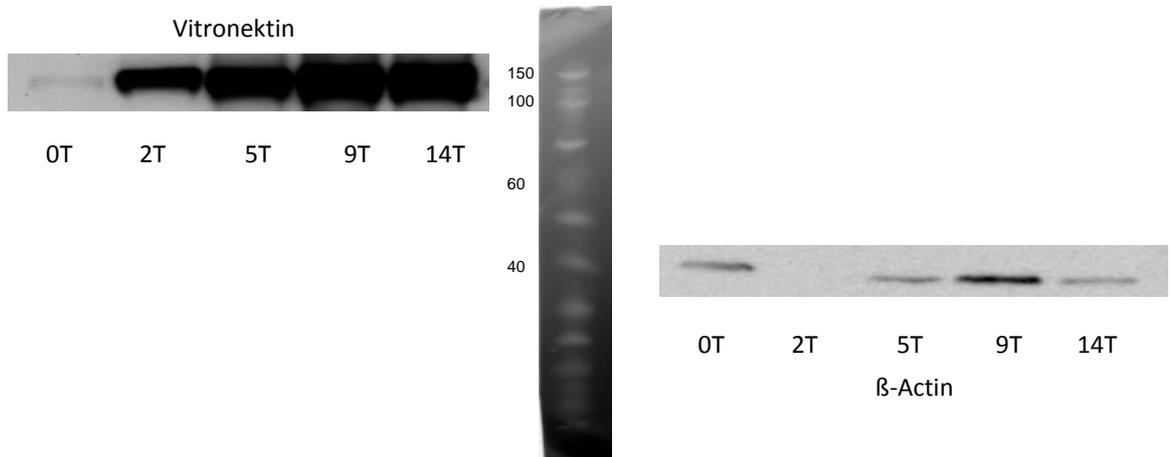


Abbildung 26: Dargestellt ist der Western Blot von Integrin alpha-V (Vitronectin 140 bis 150 kDa, 1:100) an den Tagen 0, 2, 5, 9 und 14 aus dem Versuch A. Zu der Kontrolle dient hier das *housekeeping*-Gen β -Actin, welches sich bei der 42 kDa-Bande darstellte.

3.6 Etablierung des Systems

Genexpression TRAP, Cathepsin K, VNRT, MMP 9 und RANK aus dem Versuch A

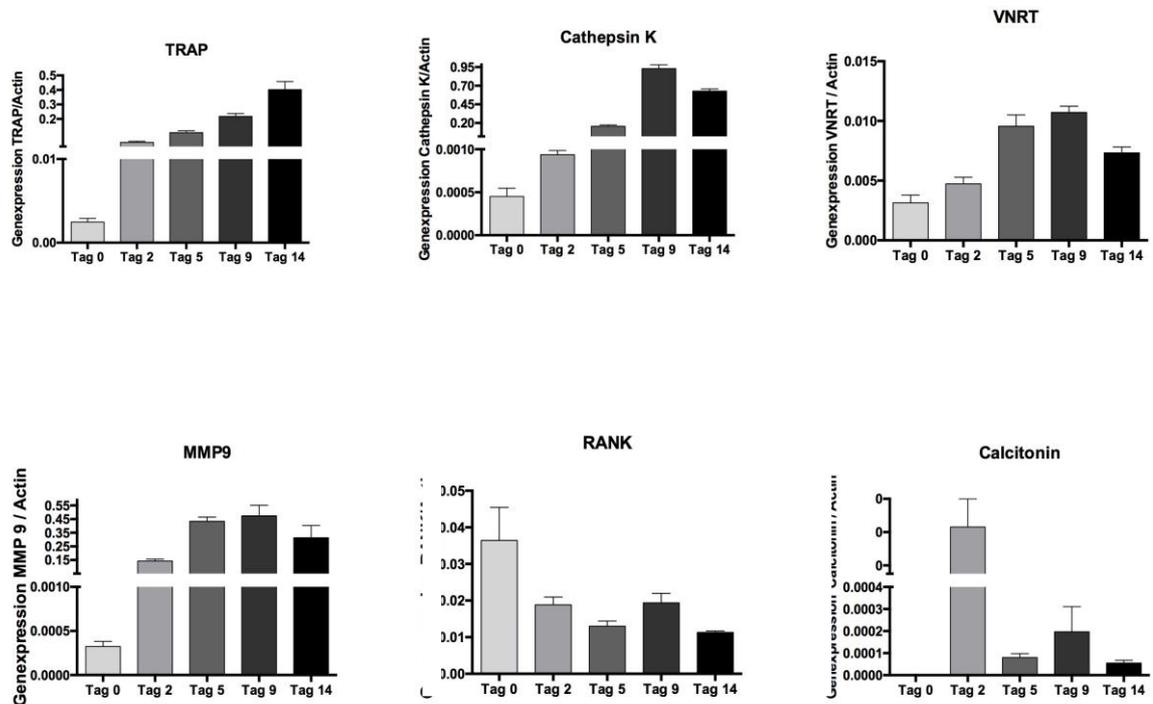


Abbildung 27: Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenmarker aus dem Etablierungsversuch A (Tag 14 der Osteoklastenkultur) (n=4).

Die Etablierungsversuche wurden unter den optimalen Versuchsbedingungen wie in Tabelle 20 beschrieben (s. S. 42) durchgeführt. Hier zeigt sich ein Anstieg der Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenmarker Cathepsin K, VNRT und MMP9 in dem Zeitraum von 9 bis 12 Tagen. Die Erhöhung von TRAP ist verzögert und zeigt weiterhin einen Anstieg an Tag 14. Die Genexpression von RANK und Calcitonin sind vermindert. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit der Resorptionsanalyse (siehe Abbildung 23). Die Resorptionsaktivität ist an Hand der Resorptionsanalysen an den Tagen 9 bis 12 am höchsten. Die Oberflächenmarker VNRT und MMP9 sind jeweils für die Haftung und die Degradierung des Knochengewebes verantwortlich und können für die Aktivität der Osteoklasten herangezogen werden (Ghayor et al. 2011).

Genexpression TRAP, Cathepsin K, VNRT, MMP 9 und RANK aus dem Versuch B

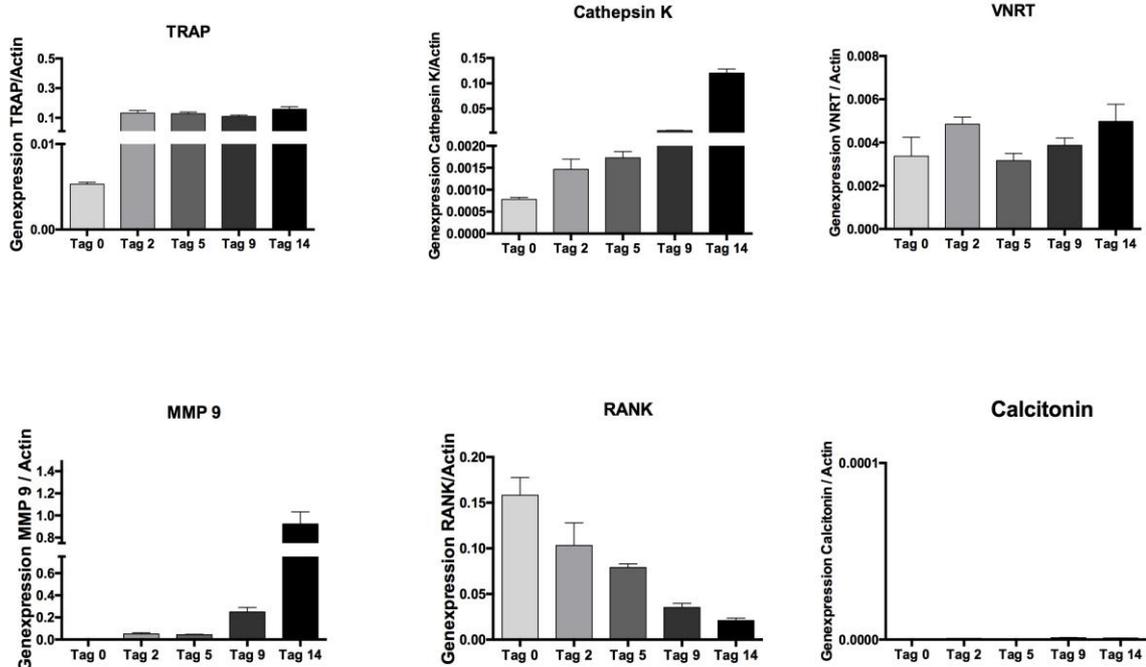


Abbildung 28: Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenmarker aus dem Etablierungsversuch B (Tag 14 der Osteoklastenkultur) (n=4).

Die Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenmarker sind im Versuch B im Gegensatz zum Versuch A zeitverzögernd. Jedoch zeigt sich wie im Versuch A der gleiche Anstieg von Cathepsin K, VNRT und MMP 9. Eine Expression von Calcitonin zeigte sich nicht. Die Expression von RANK zeigte sich vermindert. TRAP hatte seine maximale Expression am Tag 14 im Versuch A. Durch die zeitliche Verzögerung ist bei Exploration auch hier ein Anstieg nach fünf Tagen zu erwarten. Die zeitliche Verzögerung um ca. fünf Tage ist wiederum erklärbar durch die unterschiedlichen Ausgangsmaterialien. Die Differenzierung der Monozyten aus dem Material des Spenders für den Versuch B scheinen im Vergleich zu dem Spendermaterial aus Versuch A einen höheren zeitlichen Bedarf zu haben. Weitere mögliche Gründe könnten auch eine unreinere Population oder eine Schädigung der Zellen im Rahmen der Aufarbeitung gewesen sein.

Genexpression TRAP, Cathepsin K, VNRT, MMP 9 und RANK aus dem Versuch C

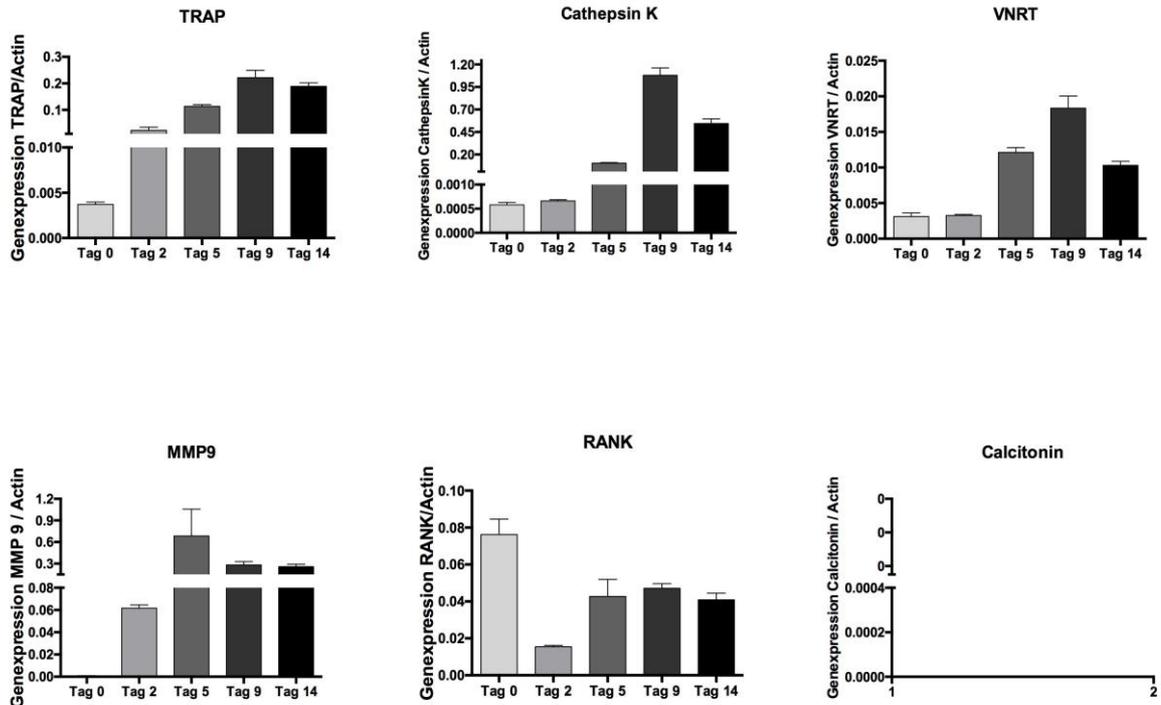
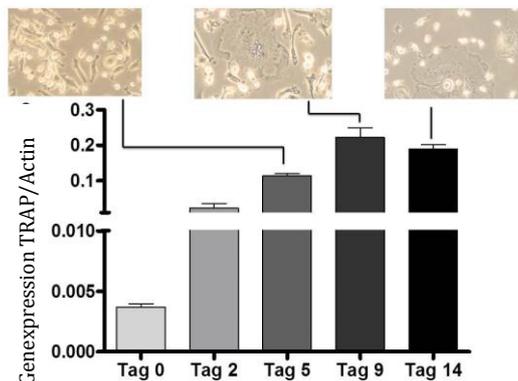


Abbildung 29: Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenmarker aus dem Etablierungsversuch C (Tag 14 der Osteoklastenkultur) (n=4).

Der Versuch C zeigt einen nahezu identischen Ablauf wie bei dem Versuch A. Hier ist die Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenmarker von Cathepsin K und VNRT an Tag 9 am höchsten und nimmt im Verlauf wieder ab. Die Genexpression von MMP9 hat sogar einen höheren Wert an Tag 5, welches jedoch nicht signifikant ist. Die Genexpression von RANK und Calcitonin sind in allen drei Etablierungsversuchen im Verlauf eher fallend als ansteigend. Die Calcitonin-Genexpression ist bis auf in Versuch A nicht messbar. Die Genexpression von TRAP ist an den Tagen 9 bis 14 am höchsten und



decken sich mit den Daten aus dem Versuch A.

Abbildung 30: Gesondert dargestellt ist die Genexpression von TRAP mit Darstellung der Fotos zu den einzelnen Zeitpunkten aus dem Etablierungsversuch C (n=4).

4 Diskussion

Der Knochen steht im ständigem Auf- und Abbau. Die Erhaltung des Knochengewebes unterliegt einem ausgeklügelten Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht herrscht zwischen den knochenbauenden Osteoblasten und den knochenabbauenden Osteoklasten. Diese Balance kann durch viele Mediatoren aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Hierunter zählt auch die chronische Darmerkrankung Morbus Crohn, die vor allem in ihrem aktiven Schub verschiedene Zytokine produziert und somit die Knochenzellen bei ihrer Differenzierung beeinflusst (Blaschke et al. 2018). Die Crohn-Erkrankung ist assoziiert mit einer erhöhten Prävalenz einer Osteoporose, einer Komplikation, die zunehmend als Ursache von signifikanter Morbidität erkannt wird, mit deutlich negativer Auswirkung sowohl auf die Lebensqualität als auch die Lebenserwartung (Jalava et al. 2003; Johnell et al. 2004; Schulte 2004; Kluge et al. 2007). Das genaue Zusammenspiel zwischen der erhöhten Frakturrisiko und Morbus Crohn ist immer noch eine spannende offen gebliebene Frage. Ein eindeutiger Zusammenhang konnte bis dato nicht identifiziert werden. Hier kommt neben geringer Bewegung, erhöhtem BMI auch die Erkrankung selbst mit ggf. Glucocorticoidtherapie in Frage (von Scheven et al. 2014). Die Osteoklastendifferenzierung, vor allem in Bezug auf die Zytokinwirkung, ist nur eingeschränkt beschrieben. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Osteoklasten, die über die Zwischenstufe der Monozyten aus den hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen, gelegt. In den Versuchen konnte ein direkter und indirekter Effekt auf die Differenzierung und auf die Aktivität der Osteoklasten durch die Wirkung der Zytokinkombination, die in dieser Form auch bei Morbus-Crohn-Patienten gemessen wurden, dargestellt werden. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse Hinweise, dass nicht nur die Zytokine, sondern auch weitere Mediatoren beteiligt sein müssen, die in dieser Arbeit diskutiert werden. Zum besseren Verständnis der Diskussion werden in dieser Arbeit die Zytokine (IL-1 β , IL-6 und TNF- α), die über einen längeren Zeitpunkt während der Differenzierung zu den Zellen hinzugefügt wurden, als Zytokinkombination definiert.

Die Monozyten wurden in dieser Arbeit aus *buffy coats* von gesunden Spendern isoliert. Diese Zellen können bedingt durch Geschlecht, Alter, Hormonstatus der Spender und anderer Faktoren interindividuell unterschiedlich sein und können so die Ergebnisse beeinflussen. Der Vorteil besteht jedoch im klinischen Bezug. Die hervorgerufenen Veränderungen *in vitro* sind relativ authentisch auf den menschlichen Organismus projizierbar (Marie 1999; Siggelkow et al. 2003).

4.1 Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen

Die Differenzierung der Osteoklasten unterliegt vor allem dem Einfluss der Zytokine M-CSF und RANKL. Durch die Bindung dieser Zytokine an Monozyten und Osteoklasten-Vorläuferzellen werden Signalwege für die Differenzierung zu reifen Osteoklasten aktiviert. In den Versuchen konnten wir herausstellen, dass nicht nur der Zeitpunkt der Zuführung von M-CSF und RANKL wichtig ist, sondern auch die Konzentration. Um diese optimale Versuchsbedingungen herauszufinden wurden in 4 Versuchen unterschiedliche Zeitpunkte und Konzentrationen der Osteoklastendifferenzierungsmodulatoren M-CSF und RANKL gewählt (siehe Tabelle 19).

Neben der optischen Kontrolle unter dem Lichtmikroskop wurden auch die Genexpressionen der osteoklastenspezifischen Oberflächenproteine bestimmt. Jedoch ist auch wieder hier zu beachten, dass das Ausgangsmaterial von unterschiedlichen Spendern stammte und somit jede Zelle unterschiedlich auf die Induktion der Differenzierung durch die Versuchsbedingungen reagieren kann. Durch den Vergleich der Versuche konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die optimalen Versuchsbedingungen folgende sind:

	Optimale Versuchsbedingungen
RNA-Isolierung	14 d
Zellzahl pro Well	1.000.000
Zytokinstimulation	7 d, 9 d, 12 d
Mediumwechsel	2 d: 2 ml, ab 5 d: 1 ml
RANKL/M-CSF	10 µl/2,5 µl

Tabelle 20: Dargestellt sind die aus den Vorexperimenten ermittelten optimalen Versuchsbedingungen während der Kultivierung der Monozyten.

Diese Konstellation der Osteoklastendifferenzierung lieferten in der quantitativen und qualitativen Analyse die besten Ergebnisse. Bei einer zu langen Kultivierung der Zellen kommt es ab dem Tag 14 wieder zu einem vermehrten Absterben der Osteoklasten und wahrscheinlich Eingang in die Apoptose (siehe Abbildung 10). Auch ein frühzeitiger und ausreichender Mediumwechsel, vor allem in den ersten Tagen der Differenzierung schien für die Entwicklung der Osteoklasten entscheidend, da aufgrund weiterer nicht dargestellter Versuche eine Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten bei einem späterem Mediumwechsel ausblieb. Aufgrund des Vergleiches der 4 durchgeführten Versuche, zeigte sich eine bessere Differenzierung bei einer Zellzahl von 1.000.000, da

höchstwahrscheinlich die Zellen einen engeren Kontakt zu der Fusion eines mehrkernigen Osteoklasten brauchen.

4.2 Zytokinkombination führt zu der erniedrigten Expression von Oberflächenproteinen

Isolierte Monozyten wurden mit der Zytokinkombination (IL-1 β ; IL-6; TNF- α) behandelt und die Genexpression von den osteoklastenspezifischen Oberflächenmarkern bestimmt. Hier zeigte sich eine Abnahme der TRAP, Cathepsin K, MMP9, VNRT und RANK Expression unter der Zytokinkombination in den Versuchen 2 bis 4 (siehe Abbildung 12), jedoch ein Anstieg der Resorption. Dieser Unterschied könnte darauf beruhen, dass ggf. nur auf Proteinebene durch Einfluss von noch nicht bekannten Faktoren ein Anstieg der Resorption statt findet oder aber auch durch den großen Aktivitätsaufwand der Resorption die Genexpression reduziert wurde.

In relativen Zahlen betrug die Expressionsabnahme von Cathepsin K 25 %. Der Versuch 1 dagegen zeigte eine Tendenz in die entgegengesetzte Richtung. Die Ergebnisse aus dem Versuch 1 sind durch mehrere Faktoren begründbar. Neben der schlechten Differenzierung, bedingt durch das Ausgangsmaterial die mittels Lichtmikroskop auch optisch festgestellt werden konnte, sind auch Faktoren wie der Zeitpunkt der Zytokinstimulation und die Dauer der Kultivierung entscheidend. Im Versuch 1 erfolgte die Zytokinstimulation der Zellen zu einem viel früheren Zeitpunkt. Die Monozyten waren mit hoher Wahrscheinlichkeit während der frühen Behandlung mit Zytokinen noch im sehr frühen Differenzierungsprozess und waren somit eventuell noch gar nicht für die Zytokinstimulation zugänglich. Ein weiterer und eher bedeutender und ausschlaggebender Punkt ist die Dauer der Kultivierung. Im Vergleich zu Versuch 3 und 4 ist die Dauer der Kultivierung um 4 bzw. 5 Tage verlängert. Möglicherweise ist die Osteoklastenkultivierung ab dem Tag 17 nicht mehr effizient, da die Osteoklasten ab dem Tag 12 wahrscheinlich langsam in die Apoptose eingehen. Diese Vermutung beruht auf der rein qualitativen Analyse durch das Lichtmikroskop. In der Literatur wurde vereinzelt eine vermehrte Osteoklastogenese nach Zugabe von Zytokinen beschrieben. Somit wurde auch in dieser Arbeit eine Erhöhung der Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenproteine erwartet (Duplomb et al. 2008). Trotz der Erwartungen, konnte in den Versuchen gezeigt werden, dass die direkte Wirkung der Zytokinkombination bei der Differenzierung eine Abnahme der Genexpression der Oberflächenproteine der Osteoklasten hat. Hierfür können mehrere Gründe verantwortlich sein. Die Zugabe der Zytokinkombination ohne Interaktion von Osteoblasten zeigte keinen signifikanten Effekt. In der Literatur wird vor allem der indirekte Effekt über Osteozyten diskutiert, die wiederum mit den Osteoblasten kommunizieren und sie modulieren (Bakker

et al. 2014). Kulkarni beschreibt in seiner Arbeit im Jahre 2012 die vermehrte Produktion von RANKL durch Osteozyten, welches zuvor mit IL-1 β behandelt wurden. IL-6 ist ein weiteres Zytokin, welches in der Kombination mit IL-1 β und TNF- α in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Dieses zeigt in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf den Knochenumbau. Die Autoren beschreiben sowohl eine katabole als auch eine anabole Wirkung des Zytokins IL-6. Eine chronische Überexpression von IL-6 erhöht den Knochenumbau und verursacht einen Verlust von Knochenmasse durch Erhöhung der Knochenresorption (De Benedetti et al. 2006; Rufo et al. 2011). Allerdings sind auch Knockout- Mäuse ohne IL-6 untersucht worden, die eine verringerte Knochenmasse, geringere Anzahl an Osteoblasten und eine verzögerte Frakturheilung aufwiesen (Yang et al. 2007). Somit ist auch in der Literatur die Frage der direkten Wirkung von Zytokinen wie IL-6 auf den Knochenumbau nicht eindeutig geklärt. Die Ergebnisse bezüglich IL-6 dieser Arbeit weisen auf die gleiche Richtung wie mit der Publikation von Laurence Duplomb (Duplomb et al. 2008). Duplomb beschreibt in seiner Arbeit, dass die Zugabe des Zytokin IL-6 die RANKL-induzierte Osteoklastogenese in den Osteoklasten durch den STAT3-Signalweg inhibiert, jedoch in den Osteoblasten einen indirekten Effekt mit Induktion von RANKL fördert. Die Ergebnisse dieser Arbeit mit der erniedrigten Expression von den osteoklastenspezifischen Oberflächenmarkern durch direkte Wirkung der Zytokine unterstützen diese These. In dieser Arbeit wurde auch der indirekte Effekt der Zytokine durch Osteoblasten analysiert und im folgenden Abschnitt diskutiert.

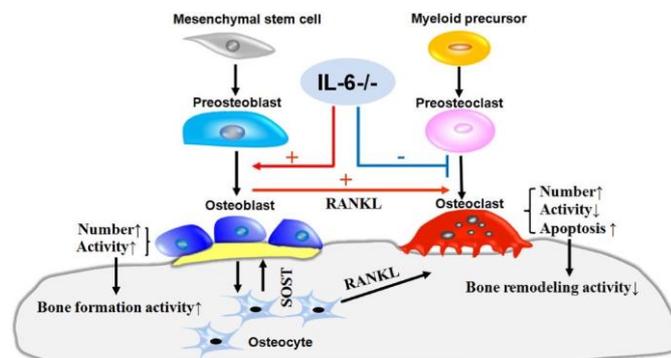


Abbildung 31: Schematische Darstellung des hypothetischen Einflusses von IL-6-Mangel auf den Knochenumbau. IL-6-Mangel reguliert die Differenzierung von Osteoklasten bei direkter Inhibition (blaue Linie) und indirekter Aktivierung (rote Linie) der Osteoklastogenese (Liu et al. 2014). „Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Journals of Histochemistry&Cytochemistry.“

4.3 Indirekte Wirkung von Zytokinen

Die isolierten Monozyten wurden neben der direkten Zugabe der Zytokinkombination mit Überständen aus der SCP-1-Zellreihe, die zuvor 48 Stunden mit Zytokinen inkubiert wurden, behandelt. Zuerst wurden die Ergebnisse mit der direkten Zytokinkombination verglichen (Abbildung 14). Hier stellte sich eine erhöhte Abnahme der

osteoklastenspezifischen Oberflächenproteine dar. Bei der Analyse der Osteoklasten mit inkubierten Zytokinen und den Überständen, konnte eine deutliche signifikante Erhöhung der Expression der Oberflächenproteine RANK und VNRT gezeigt werden (Abbildung 15). Der erste Vergleich mit der direkten Zytokingabe und den Überständen aus der SCP-1-Zellreihe, die zuvor 48 Stunden mit Zytokinen behandelt wurden, ist in seiner Aussagekraft eingeschränkt. In diesem Vergleich ist die Gabe der Überstände innerhalb von 48 Stunden an den Tagen 10 und 13, dem der Gabe ab dem Tag 2, entgegengestellt. Aufgrund der Tatsache, dass die direkte Zytokingabe über einen längeren Zeitpunkt bei unterschiedlichen Differenzierungszuständen der Osteoklasten zugegeben wurde und die Überständen an einem Zeitpunkt der fortgeschrittenen Differenzierung, ist der Effekt im Vergleich nicht mehr signifikant messbar. Die erhöhte Abnahme der Oberflächenproteine der Osteoklasten sind durch den normalen Abbau und Apoptoseprozess erklärbar, welche auch in den Etablierungsversuchen so experimentell gezeigt werden konnte (Abbildung 28).

Aus diesem Grunde wurde der Vergleich mit Zytokinen, die 48 Stunden in Medium ohne Zellen inkubiert worden (inkubierten Zytokinen), gezogen. Hier stellte sich eine erhöhte Expression der osteoklastenspezifischen Oberflächenproteine dar. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der indirekte Effekt durch die Zytokinkombination deutlich dem Effekt der direkten Wirkung überlegen ist. Der indirekte Effekt wird durch die vermehrte Produktion von RANKL durch die Osteoblasten und Osteozyten, wie es in der Literatur beschrieben ist, verursacht. Die Überstände, die mit Zytokinen behandelt wurden, zeigten des Weiteren einen erhöhten RANKL/OPG Quotienten und bestätigen somit diese These (siehe Abbildung 13). Ein neuer Aspekt aus dieser Arbeit, der hinzukommt, ist die vermehrte Expression von RANK und VNRT direkt auf den Osteoklastenvorläuferzellen. Wahrscheinlich ist die vermehrte Differenzierung zu reifen Osteoklasten nicht nur durch die erhöhte RANKL Konzentrationen bedingt, sondern auch durch die vermehrte Expression des Rezeptors. In den Versuchen ist auch zu sehen, dass die Expression des Oberflächenproteins TRAP sich durch die Zugabe der Überstände nicht signifikant verändert. In dem Fall RANK und VNRT wird jedoch die Expression durch die Zugabe der Überstände signifikant verringert (Abbildung 15). Hieraus kann man vermuten, dass sich die Osteoklastenzahl nicht signifikant vermehrt, sondern der Effekt sich vor allem durch die vermehrte Aktivität der Osteoklasten äußert. Die Vermutung, dass die RANK Expression bei der Differenzierung eine größere Rolle spielt als die RANKL Konzentration, wird auch durch die Literatur bestätigt. Teitelbaum beschreibt in seiner Arbeit, dass ein moderater Anstieg der Affinität für RANK zu einer erheblichen Steigerung der Osteoklastenbildung führt, wobei sehr hohe Affinitäten von RANKL weniger effizient sind (Warren et al. 2015).

4.4 Resorptionsanalyse

Wie im letzten Kapitel beschrieben, spielt neben der Differenzierung und Anzahl der Osteoklasten auch die Aktivität eine wesentliche Rolle. In der Genexpressionsanalyse der osteoklastenspezifischen Oberflächenproteine konnte ermittelt werden, dass die Osteoklastenzahl sich nicht signifikant verändert hat, jedoch die Aktivität deutlich zunahm. Hierbei konnte man für die Anzahl der Osteoklasten die Genexpression von TRAP und für die Aktivität die Genexpression von VNRT und MMP9 verwenden (Ballanti et al. 1997; Ghayor et al. 2011). Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit neben einer qualitativen Analyse auch eine quantitative Bestimmung der Aktivität der Osteoklasten durchgeführt. Als erstes wurde ein Versuch gestartet, um die Resorptionsaktivität der differenzierten Osteoklasten auf Dentinscheiben quantitativ zu analysieren. Hierfür wurden die Osteoklasten direkt auf Dentinscheiben nach der Isolierung kultiviert und mit der Zytokinkombination behandelt. Aus der optischen und Genexpressionskontrolle konnte von einer erfolgreichen Kultivierung und Differenzierung der Osteoklasten ausgegangen werden. Das Problem gestaltete sich bei der Auswertung der Resorptionslakunen auf den Dentinscheiben. Aufgrund der nicht einheitlichen Ebene der Scheiben, stellte sich die Analyse auch unter einem Elektronenmikroskop nicht adäquat auswertbar dar. Um jedoch ein auswertbares Ergebnis zu bekommen wurde im nächsten Versuch die Resorptionsanalyse mit einem 24-Well-Resorptionsassay durchgeführt. Hierfür wurden die isolierten Vorläuferzellen direkt auf dem Assay kultiviert. Nach Tag 9 wurde die Fluoreszenzintensitäten der verbrauchten Areale bei den Wellenlängen 485nm und 535nm gemessen (siehe Abbildung 20). Die Auswertung der Resorptionsanalyse war nicht möglich, da die Positivkontrolle der Osteoklasten, welche mit M-CSF und RANKL behandelt wurden, keine erhöhte Fluoreszenz zeigten. Außerdem fehlte in diesem Assay der ausschlaggebende Vergleich zwischen Überständen und inkubierten Zytokinen. Dieser Vergleich zeigte in der Genexpressionsanalyse, die erhöhte Aktivität der Osteoklasten und somit den indirekten Effekt. Bei dem Vergleich der Zytokinkombination mit den Überständen zeigte sich eher eine Abnahme der Expression, weshalb dieser Vergleich in seiner Aussagekraft limitiert war.

In der dritten Versuchsreihe wurde die Osteoklastenaktivität anhand der Saos-2-Zellen Matrix bestimmt. Diesbezüglich wurden Monozyten zu reifen Osteoklasten auf der Matrix kultiviert und quantitativ die degradierte Fläche der Matrix bestimmt. Die Zellen wurden analog, wie bei der Genexpressionsanalyse mit der Zytokinkombination, mit den Überständen und den inkubierten Zytokinen behandelt und die Resorptionsflächen durch optische Normierung verglichen. Für das Erreichen einer guten Evidenz wurden alle Wells jeweils systematisch fünfmal an den identischen Bereichen fotografiert und mit dem Image J Programm anschließend analysiert. Pro Versuchsansatz wurden vier Wells

benutzt, somit liegen für jeden Endwert 20 Messwerte vor. In der Resorptionsflächenanalyse zeigte sich eine signifikante Zunahme der Resorptionsflächen bei Zugabe der Überständen aus der SCP-1-Zellreihe im Vergleich zu den reinen Zytokinen, die für 48 Stunden in Medium inkubiert wurden. Der Vergleich der Zytokinkombination mit den Überständen sowie der Vergleich der Zytokinkombination mit unbehandelten Osteoklasten zeigte keine signifikante Veränderung (siehe Abbildung 21). Somit wurde die These der indirekten Wirkung der Zytokine über die Osteoblasten mit der vermehrten RANK -und RANKL Induktion auch durch die Resorptionsanalyse bestätigt. Die direkte Wirkung der Zytokinkombination ist wahrscheinlich in den Versuchen dieser Arbeit nicht so stark ausgeprägt, sodass sie nicht in Form der Resorption darstellbar ist, sondern nur durch die Genexpression gezeigt werden konnte. Die indirekte Wirkung, wie oben schon diskutiert, führt zu einer vermehrten Aktivität der Osteoklasten durch den STAT-3-Signalweg in den Osteoblasten.

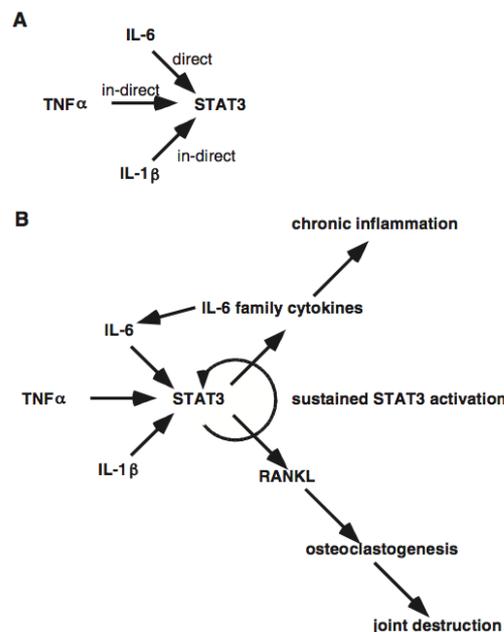


Abbildung 32: STAT-3-Signalweg mit direkten und indirekten Effekten auf die Osteoklastogenese (Mori et al. 2011). „Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Oxford University Press.“

A: Wirkung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α auf den STAT-3-Signalweg, B: Die STAT-3-Aktivierung ist gefolgt von der Expression der IL-6-Familie zugehörigen Zytokine, die wiederum den STAT-3-Signalweg Autokrine/Parakrine aktivieren. STAT-3-Aktivierung induziert des Weiteren die Expression von RANKL, welches ein Induktor des Osteoklastogenese ist.

4.5 Osteoklastendifferenzierung und -aktivität am höchsten an Tag 9

Nachdem die optimalen Bedingungen für die Osteoklastendifferenzierung und Kultivierung sowie der Resorptionsanalyse ermittelt wurden, konnten drei identische Versuche zu der Etablierung des Osteoklastensystems durchgeführt werden. Die Etablierungsversuche wurden mit der Genexpressions- und Resorptionsanalyse zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung erweitert. In den zuvor durchgeführten Versuchen wurden alle Ergebnisse nach endgültiger Differenzierung an Tag 17 bis 21 entsprechend den Versuchsplanungen durchgeführt. Die in den Etablierungsversuchen durchgeführte Osteoklastenresorptionsanalyse auf Saos-2-Zellen-Matrix zeigte eine signifikante Resorption der Matrix von dem Tag 9 bis 12, die gegen Ende der Kultivierung an Tag 14 wieder etwas an Signifikanz abnahm. Hieraus kann man erschließen, dass das höchste Maß der Aktivität der Osteoklasten an den Tagen 9 bis 12 der Kultivierung ist. Jedoch ist hier auch ein Fehler durch die Streuung der Kontrollwerte zu berücksichtigen, so dass keine sichere Aussage über den zeitlichen Verlauf der Aktivität anhand dieser Messungen getroffen werden kann. Die Abnahme der Resorptionsfläche an Tag 14 ist a. e. einem Messfehler zuzuordnen, da eine Zunahme der Saos-2-Matrix ausgeschlossen ist. Die Osteoklastenaktivität zeigte sich an den Tagen 12 und 14 im Vergleich zu der Kontrolle gleichbleibend.

4.6 Osteoklastendifferenzierung und Genexpression am höchsten an Tag 9

Neben der Resorptionsanalyse an unterschiedlichen Zeitpunkten, wie im Abschnitt 4.5. diskutiert, wurde in dem Etablierungsversuch an unterschiedlichen Zeitpunkten die Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenmarker bestimmt und jeweils optische Kontrollen durchgeführt. Es zeigte sich ein Anstieg der Genexpression von TRAP, Cathepsin K, VNRT und MMP9 und eine erniedrigte Genexpression von RANK (Abbildung 14 und 15). In den Etablierungsversuchen wurden außer RANKL und M-CSF keine weiteren Zytokine zu der weiteren Stimulation hinzugefügt. Der zeitliche Anstieg und anschließende Abfall nach Tag 12 korreliert auch mit den Ergebnissen aus der Resorptionsanalyse. Aus den Versuchen kann man nachfolgend den Schluss ziehen, dass sowohl die Differenzierung als auch die Aktivität um den Tag 9 bis 12 am höchsten ist und durch einen möglichen Beginn der Apoptose von reifen Osteoklasten im Verlauf wieder fällt. Zytokine wie M-CSF, RANKL, IL-1 β , IL-6 und TNF- α wirken als *survival factors* antiapoptotisch in Osteoklasten, indem sie die Aktivierung von Caspasen unterdrücken und antiapoptotische Signalwege wie Akt, NF κ B und ERK aktivieren (Roux und Brown 2009). Die Abnahme von dem Oberflächenprotein RANK, welches als

Rezeptor für das lösliche Zytokin RANKL dient, ist wahrscheinlich durch die Differenzierung im Verlauf bedingt. Etwa 30 % der isolierten Monozyten differenzieren sich zu Osteoklasten während der ganzen Kultivierung. Die hohe Expression von RANK an Tag 0 und der kontinuierliche Abfall in den darauffolgenden Tagen kann mit der Abnahme der Monozyten und der absoluten Anzahl von Osteoklasten erklärt werden. Die hohe Expression an Tag 0 kommt wahrscheinlich durch die hohe Anzahl von nicht differenzierten Monozyten, die auf ihrer Oberfläche RANK exprimieren, zustande (Mosheimer et al. 2004). Auf der einen Seite fusionieren mehrere Monozyten zu einem Osteoklasten und auf der anderen Seite schlagen die nicht differenzierten Monozyten den Weg der Apoptose ein.

Das abweichende Ergebnis des zweiten Versuches kommt am ehesten durch eine zeitliche Verzögerung der Differenzierung zustande. Bei der Exploration ist zu ersehen, dass der zweite Versuch insgesamt um 5 Tage verschoben ist. Der Grund dieser Abweichung ist mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die individuellen Zellen des Spenders gut erklärbar, da es sich hier um eine rein zeitliche Verzögerung handelt und die Expression der Oberflächenproteine sich in der Tendenz nicht von den anderen beiden Versuchen unterscheidet.

4.7 Western Blot: Aussagekraft

Nach der Genexpression konnte mit dem durchgeführten Western Blot die Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden. Durch die zeitliche Analyse ist auch hier zu sehen, dass die Expression auf Proteinebene an den Tagen 9 bis 14 am höchsten liegt. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen aus der Genexpressionsanalyse. Die Darstellung von Cathepsin K im Vergleich zu VNRT ist insgesamt schwächer und ist zu einem späteren Zeitpunkt. Dieses ist auch durch den physiologischen Mechanismus während der Knochenresorption zu erklären. Das VNRT dient zu der Anheftung der Osteoklasten auf der zur resorbierende Fläche, wobei das Cathepsin K die Knochenmatrix degradiert. Erst nach dem Anheften der Osteoklasten entsteht die *sealing zone*, in dem die degradierenden Enzyme einwandern können und die Knochenmatrix degradieren.

4.8 Rückblickender Vergleich der Versuche 1-4 und der Etablierungsversuche

Rückblickend wurden Ergebnisse bezüglich der Expressionsdimension der Oberflächenmarker mit den Versuchen 1 bis 4 und den 23 identischen Versuchen beim etablieren des Systems verglichen.

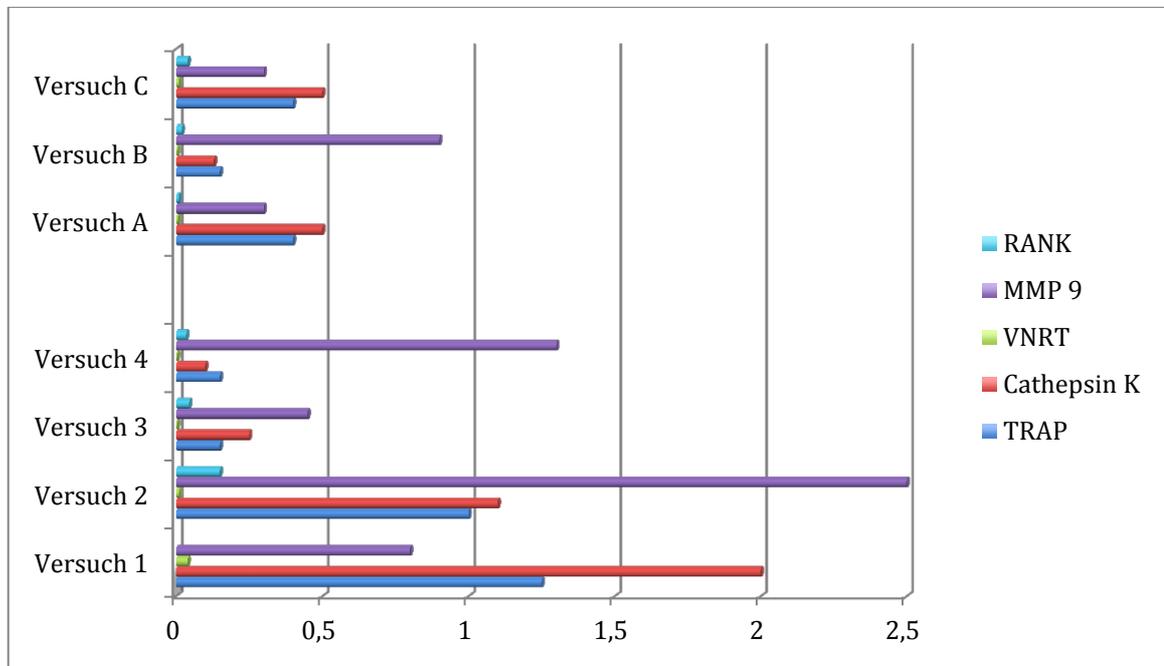


Abbildung 33: Dargestellt ist der Vergleich der Genexpression der Oberflächenmarker aus den ersten Vier Versuchen mit den Etablierungsversuchen.

In den Versuchen 3 und 4 wurden die Auswirkungen der Überstände auf die Osteoklastendifferenzierung untersucht. In den Versuchen 3 und 4 wurden jeweils weniger M-CSF und RANKL im Vergleich zu den Versuchen 1 und 2 hinzugegeben, welches die unterschiedlichen Expressionsdimensionen erklärt und somit den Vergleich der Versuche untereinander erschwert. Außerdem erfolgte insgesamt eine längere Kultivierung (21 und 22 Tage) in den Versuchen 1 und 2 als bei den Etablierungsversuchen A-C (14 Tage). Dieses könnte einer der Gründe für die höhere Expression in den Versuchen 1 und 2 sein. Bei einer gleichlangen Kultivierung in den Etablierungsversuchen A-C würden die Dimensionen der Genexpression vorraussichtlich wie bei den Versuchen 1 und 2 ausfallen. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen 1 und 2 sind somit am ehesten den optimalen Bedingungen der Etablierungsversuche A,B, C zuzuordnen.

5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde der direkte und indirekte Effekt von der Zytokinkombination IL-1 β , IL-6 und TNF- α auf die Osteoklastendifferenzierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die direkte Wirkung dieser Zytokinkombination unter den gewählten Bedingungen auf die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung sowie die Osteoklastenfunktion keinen signifikanten Einfluss hat. Erst durch den indirekten Effekt über die vermehrte Produktion von RANKL aus Stromazellen und Osteoblasten konnte eine vermehrte Osteoklastendifferenzierung erreicht werden. Hierbei wird eine erhöhte Affinität durch synergistisches Wirken von TNF- α mit RANKL sowie eine erhöhte Expression von RANK durch die Zytokinkombination und die Signalwege STAT-3 und MAP in Osteoklasten erreicht (Kim et al. 2009). In den Resorptionsanalysen wurde diese These bestätigt. Eine vermehrte Resorption zeigte sich bei Osteoklasten, die mit Überständen aus Osteoblasten behandelt wurden. Die Osteoblasten wurden in einem separaten Versuch mit der oben genannten Zytokinkombination vorbehandelt. Neben der Untersuchung der quantitativen und qualitativen Aktivität, Differenzierung und Anzahl der Osteoklasten, wurden in dieser Arbeit auch die optimalen Versuchsbedingungen für die Osteoklastendifferenzierung aus humanen Monozyten ermittelt. Da die indirekte Wirkung der Zytokinkombination durch das Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten eine signifikante Rolle spielt, sind auch weitere Untersuchungen in Co-Kulturen sinnvoll. Das etablierte System bietet nun die Möglichkeit, weitere sekundäre Osteoporoseformen bezüglich des lokalen Effekt auf die Osteoblasten- und Osteoklasteninteraktion zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Die Erkrankung Morbus Crohn ist assoziiert mit einer erhöhten Prävalenz einer Osteoporose sowie Frakturen, dessen Pathogenese noch umstritten ist. Unter den wichtigsten Einflüssen steht jedoch die Krankheitsaktivität, insbesondere der Konzentrationsanstieg der Zytokinkombination (IL-1, IL-6 und TNF-alpha) im Focus. In dieser Doktorarbeit wurde die direkte und indirekte Wirkung dieser Zytokinkombination, wie sie in Morbus-Crohn-Patienten gemessen wurde, auf die Differenzierung der Osteoklasten sowie ihre Aktivität untersucht. Gleichzeitig wurden die optimalen Bedingungen für die Kultivierung der Osteoklasten aus Monozyten durch verschiedene Versuchsansätze ermittelt.

Aus gespendeten *buffy coats* erfolgte die Isolation von Monozyten mittels spezieller Magnet Separationsmethode der MACS Technology. Mittels Zugabe von RANKL 100ng/ml und M-CSF 25ng/ml in einem Zeitrahmen von 14 bis 21 Tagen erfolgte die Stimulation in Richtung Osteoklasten. In mehreren Versuchsansätzen erfolgte eine Variation der Konzentration und des Zugabezeitpunktes der jeweiligen Zytokine und Zytokinkombinationen. Neben der Zytokinkombination wurden außerdem Überstände von Osteoblasten, welche zuvor 48 Stunden mit der Zytokinkombination (IL-1, IL-6 und TNF-alpha) behandelt wurden, hinzugefügt. Für die quantitative Genanalyse wurde Realtime-PCR und für die qualitative Analyse Färbungen mittels Toludinblau und TRAP eingesetzt. Die Aktivitätsmessung der Osteoklasten erfolgte auf einer Matrix, die mit Hilfe von SAOS-2-Zellen hergestellt wurde, sowie dem Resorptionsassay-Kit 24 von CSR-BRA-24. Eine Immunfärbung erfolgte mittels Antikörper für VNRT und Analysen auf Proteinebene mittels Western Blot für Cathepsin K und Vitronektin. Zu der statistischen Auswertung diente die Varianzanalyse ANOVA innerhalb des Programms *GraphPad Prism*.

Anhand der Genexpression der spezifischen Osteoklastenproteine wie VNRT, Cathepsin K, TRAP und MMP 9 wurde eine erfolgreiche Kultivierung und Differenzierung von Osteoklasten dargestellt. Unter der Zugabe der Zytokinkombination (IL-1, IL-6 und TNF-alpha) konnten wir eine direkte hemmende Wirkung auf die Osteoklastenaktivierung zeigen. Nach Zugabe der Überstände der zytokinbehandelten Osteoblasten auf die Osteoklasten zeigte sich eine Erhöhung der Oberflächenmarker der Osteoklasten. Übereinstimmend konnte eine signifikant erhöhte Rate der Resorption bei Verwendung der Überstände in der Resorptionsanalyse nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte somit ein direkter sowie indirekter Effekt der Zytokinkombination von IL-1, IL-6 und TNF-alpha, dargestellt werden. Die Abnahme der Genexpression der Osteoklastenmarker bei ansteigender Resorptionsaktivität könnte durch die Verschiebung

des RANKL/OPG zugunsten des RANKL bedingt sein. Aber es kommen auch andere, noch nicht bekannte Faktoren in Frage, die nur auf Proteinebene einen Einfluss zeigen. Die Reduzierung der Genexpression wäre u. a. auch durch den großen Aktivitätsaufwand der Osteoklasten im Rahmen der Resorption erklärbar. Durch die Behandlung der Osteoklasten mit den Überständen aus Osteoblasten, welche mit der Zytokinkombination behandelt wurden, zeigte sich eine deutliche Verstärkung dieser Wirkung. Weitere Untersuchungen und experimentelle Versuchsansätze, vor allem mit den in dieser Arbeit ermittelten optimalen Versuchsbedingungen, sollten hierüber Aufschluss geben.

7 Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1</u> : Verwendete Geräte und Materialien.....	18
<u>Tabelle 2</u> : Verwendete Reagenzien.....	19
<u>Tabelle 3</u> : Material für RT-PCR.....	19
<u>Tabelle 4</u> : Material für Toluidinblau-Färbung.....	20
<u>Tabelle 5</u> : Material für TRAP-Färbung.....	20
<u>Tabelle 6</u> : Material für SLP-Lösung.....	20
<u>Tabelle 7</u> : Fixierlösung.....	21
<u>Tabelle 8</u> : Realtime-PCR-Primer.....	21
<u>Tabelle 9</u> : Material für Immunfärbung.....	22
<u>Tabelle 10</u> : Material für die Proteinvorbereitung.....	22
<u>Tabelle 11</u> : Zusammensetzung des Lysepuffers.....	22
<u>Tabelle 12</u> : Material für Western Blot.....	23
<u>Tabelle 13</u> : Lösung der Westernblot-Antikörper.....	23
<u>Tabelle 14</u> : Image-J-Densitometrie.....	23
<u>Tabelle 15</u> : RT-PCR-Ansatz.....	29
<u>Tabelle 16</u> : RT-PCR-Transkriptionsprogrammeinstellung.....	29
<u>Tabelle 17</u> : Zusammensetzung des Realtime-PCR-Ansatzes.....	31
<u>Tabelle 18</u> : One-Step-plus Programm-Einstellung.....	32
<u>Tabelle 19</u> : Unterschiede der Versuchsabläufe zu der Bestimmung der optimalen Bedingungen für Gewinnung der Osteoklasten.....	40
<u>Tabelle 20</u> : Aus den Vorexperimenten ermittelte optimale Versuchsbedingungen während der Kultivierung der Monozyten.....	42

8 Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1</u> : Membrandomäne während der Osteoklastenaktivierung.....	4
<u>Abbildung 2</u> : Schematische Darstellung einer multizellulären Grundeinheit.....	5
<u>Abbildung 3</u> : Komplexität der Osteoporoseentwicklung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	15
<u>Abbildung 4</u> : Schematische Darstellung des Percoll-Gradienten.....	25
<u>Abbildung 5</u> : Polymerase-Kettenreaktion.....	30
<u>Abbildung 6</u> : Schmelzkurve des PCR-Produktes (Trap, H ₂ O).....	31
<u>Abbildung 7</u> : Schematische Darstellung der fotografierten Bereiche.....	35
<u>Abbildung 8</u> : Osteoklastendifferenzierung aus dem Versuch Nr. 1.....	38
<u>Abbildung 9</u> : Genexpression von den osteoklastenspezifischen Oberflächenproteinen im Vergleich zu der SCP-1-Zelllinie.....	39
<u>Abbildung 10</u> : Monozytendifferenzierung zu Osteoklasten aus dem Versuch Nr.1.....	40
<u>Abbildung 11</u> : Genexpression von TRAP und VNRT in allen 4 Versuchen (n = 6).....	41
<u>Abbildung 12</u> : Genexpression von TRAP, Cathepsin K, VNRT, MMP9, RANK aus den Versuchen 2 bis 4.....	43
<u>Abbildung 13</u> : Genexpression von RANKL und OPG in Osteoblasten	44
<u>Abbildung 14</u> : Genexpression der Überstände im Vergleich von Zellen mit der Zytokinkombination sowie unbehandelten Osteoklasten.....	45
<u>Abbildung 15</u> : Genexpression von Rank, VNRT, TNF- α und IL-1 β in Osteoklasten.....	46
<u>Abbildung 16</u> : Genexpression von OSCAR in Osteoklasten.....	46
<u>Abbildung 17</u> : TRAP-Färbung eines TRAP-positiven Osteoklasten.....	47
<u>Abbildung 18</u> : Fluoreszenz nach Antikörperbindung in Gegenwart des primären Antikörpers gegen VNTR sowie Negativkontrolle.....	48
<u>Abbildung 19</u> : Resorptionsassay-Kit 24 nach Entfernung der Zellen.....	50
<u>Abbildung 20</u> : Fluoreszenz auf dem Resorptionsassay-Kit nach 48 Stunden.....	51
<u>Abbildung 21</u> : Osteoklastenaktivität aus den Versuchen 3 und 4.....	52

<u>Abbildung 22</u> : Resorptionsgebiet der Zellen mit Behandlung von osteoblastären Überständen an Tag 14.....	53
<u>Abbildung 23</u> : Osteoklastenresorption an den Tagen 5, 7, 9, 12 und 14 in Kontrolle (ohne Osteoklasten) sowie mit Osteoklasten mit M-CSF und RANKL.....	54
<u>Abbildung 24</u> : Resorptionsgebiet an den Tagen 7, 9 und 12 aus den drei Etablierungsversuchen.....	55
<u>Abbildung 25</u> : Western Blot von Integrin alpha-V sowie Cathepsin K aus dem Versuch C.....	56
<u>Abbildung 26</u> : Western Blot von Integrin alpha-V aus dem Versuch A.....	56
<u>Abbildung 27</u> : Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenmarker aus dem Etablierungsversuch A.....	57
<u>Abbildung 28</u> : Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenmarker aus dem Etablierungsversuch B.....	58
<u>Abbildung 29</u> : Genexpression der osteoklastenspezifischen Oberflächenmarker aus dem Etablierungsversuch C.....	59
<u>Abbildung 30</u> : Genexpression von TRAP zu den einzelnen Zeitpunkten aus dem Etablierungsversuch C.....	59
<u>Abbildung 31</u> : Schematische Darstellung des hypothetischen Einflusses von IL-6-Mangel auf den Knochenumbau.....	63
<u>Abbildung 32</u> : STAT-3-Signalweg mit direkten und indirekten Effekten auf die Osteoklastogenese.....	66
<u>Abbildung 33</u> : Vergleich der Genexpression der Oberflächenmarker aus den ersten vier Versuchen mit den Etablierungsversuchen.....	69

9 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALP	alkalische Phosphatase
Anti-TNF-AK	Anti-Tumornekrosefaktor-Antikörper
AS	<i>antisense</i>
ATG16L1	<i>autophagy-related protein 16-1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatasen
BCA	Bicinchoninsäure
BMPs	<i>bone morphogenetic proteins</i>
BMU	<i>basic multicellular unit</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BSP	<i>bone sialoprotein</i>
c-FMS	zelluläres Protoonkogen für Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor-1-Rezeptor
c-FOS	Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 und zelluläres Protoonkogen
CD14, 25	<i>cluster of differentiation 14, 25</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CSF-1	koloniestimulierender Faktor 1
CTP	Cytosintriphosphat
D	<i>day</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ΔCt	<i>delta cycle threshold</i>
Dlx5	<i>distal-less homeobox 5</i>
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	ethylene-diamine-tetraacetic-acid
EGTA	ethylene-glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic-acid
FCS	fetales Kälberserum
GBC	<i>4'-Amino-2,3-dimethylazobenzene, o-Aminoazotoluene, Solvent Yellow 3</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
IL-1 β , 6, 12, 13	Interleukin-1 β , 6, 12, 13
LRP5/6	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
m-MLV RT	<i>moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i>
M	Molar
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MAP	Mitogen-aktivierendes Protein
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEM-alpha	minimum essential medium-alpha
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Milimolar
MMP9, 13	Matrix-Metalloprotease 9,13
MOMA-2	<i>monocyte and macrophage antibody-2</i>
MSC	mesenchymale Vorläuferzellen
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid

Naphtol AS-BI	2-Naphthalenecarboxamide, 7-Bromo-N-(2-Methoxyphen)-3-(Phosphonoxy)
HSD 1	Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1
NF- κ B	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOD 2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
NP-40	4-nonylphenyl-polyethylene glycol
OD ₂₃₀	optische Dichte bei 230nm
OPG	Osteoprotegerin
Osx	Osterix
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
Strep	Streptomycin
pg	Pikogramm
PGE 2	Prostaglandin E2
P (dt) 15	<i>primer (desoxythymidine) 15</i>
PTH	Parathormon
RANK	<i>receptor-activator-of NF-κB</i>
RANKL	<i>receptor-activator-of NF-κB Ligand</i>
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RGD	Aminosäuren Arginin, Glycin, Asparaginsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RUNX 2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
S	<i>sense</i>
SAOS	<i>sarcoma osteogenic</i>
SCP-1	<i>single-cell-derived human mesenchymal stem cell line</i>
STAT-3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
T-Zellen	T (Thymus)-Lymphozyten
Taq-Polymerase	<i>thermus aquaticus polymerase</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline (TBS) and polysorbate 20</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TM	<i>temperature of melting</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor alpha</i>
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
TTP	Thymidintriphosphat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VNRT	Vitronektin-Rezeptor
Wnt	<i>wingless and int-1</i>

10 Literaturverzeichnis

https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php; Zugriff am 09.08.2019

- Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L (2005): Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2, S36-43
- Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A (2000): Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* 275, 4858–4864
- Bakker AD, Kulkarni RN, Klein-Nulend J, Lems WF (2014): IL-6 alters osteocyte signaling toward osteoblasts but not osteoclasts. *J Dent Res* 93, 394–399
- Ballanti P, Minisola S, Pacitti MT, Scarnecchia L, Rosso R, Mazzuoli GF, Bonucci E (1997): Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry. *Osteoporos Int* 7, 39–43
- Baumgart DC, Sandborn WJ (2012): Crohn's disease. *Lancet* 380, 1590–1605
- Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA (2005): Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3324–3329
- Blaschke M, Koepp R, Lenz C, Kruppa J, Jung K, Siggelkow H (2018): Crohn's disease patient serum changes protein expression in a human mesenchymal stem cell model in a linear relationship to patients' disease stage and to bone mineral density. *J Clin Transl Endocrinol* 13, 26–38
- Böcker W, Yin Z, Drosse I, Haasters F, Rossmann O, Wierer M, Popov C, Locher M, Mutschler W, Docheva D, Schieker M (2008): Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J Cell Mol Med* 12, 1347–1359
- Bonen DK, Cho JH (2003): The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 124, 521–536
- Boyapati R, Satsangi J, Ho G-T (2015): Pathogenesis of Crohn's disease. *F1000Prime Rep* 7, 44
- Boyce BF, Xing L (2008): Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 473, 139–146
- Burger EH, van der Meer JW, Nijweide PJ (1984): Osteoclast formation from mononuclear phagocytes: role of bone-forming cells. *J Cell Biol* 99, 1901–1906
- Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, et al. (1999): The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 145, 527–538

- Candelieri GA, Liu F, Aubin JE (2001): Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone* 28, 351–361
- Chambers TJ, Fuller K (2011): How are osteoclasts induced to resorb bone? *Ann N Y Acad Sci* 1240, 1–6
- Clarke B (2008): Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3, S131-139
- De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, Vivarelli M, Muratori F, Berni S, Ballanti P, et al. (2006): Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum* 54, 3551–3563
- Duplomb L, Baud'huin M, Charrier C, Berreur M, Trichet V, Blanchard F, Heymann D (2008): Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Endocrinology* 149, 3688–3697
- Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W (2002): The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 17, 77–90
- Findlay DM, Haynes DR (2005): Mechanisms of bone loss in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 15, 232–240
- Fornadley JA, Parker GS, Rickman LS, Paparello S (1990): Candida myositis manifesting as a discrete neck mass. *Otolaryngol-Head Neck Surg* 102, 74–76
- Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A (2011): Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut* 60, 1580–1588
- Ghayor C, Corroero RM, Lange K, Karfeld-Sulzer LS, Grätz KW, Weber FE (2011): Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by N-methylpyrrolidone. *J Biol Chem* 286, 24458–24466
- Heino TJ, Hentunen TA, Väänänen HK (2002): Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen. *J Cell Biochem* 85, 185–197
- Hofbauer LC (2006): Pathophysiology of RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). *Ann Endocrinol* 67, 139–141
- Hoffmann JC, Preiss JC, Autschbach F, Buhr HJ, Häuser W, Herrlinger K, Höhne W, Koletzko S, Krieglstein CF, Kruis W, et al. (2008): S3-Leitlinie "Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn". *Z Gastroenterol* 46, 1094–1146
- Hovde Ø, Moum BA (2012): Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: results from observational studies. *World J Gastroenterol* 18, 1723–1731
- Insogna KL, Sahni M, Grey AB, Tanaka S, Horne WC, Neff L, Mitnick M, Levy JB, Baron R (1997): Colony-stimulating factor-1 induces cytoskeletal reorganization and c-src-dependent tyrosine phosphorylation of selected cellular proteins in rodent osteoclasts. *J Clin Invest* 100, 2476–2485

- Itzstein C, Coxon FP, Rogers MJ (2011): The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases. *Small GTPases* 2, 117–130
- Jalava T, Sarna S, Pylkkänen L, Mawer B, Kanis JA, Selby P, Davies M, Adams J, Francis RM, Robinson J, McCloskey E (2003): Association between vertebral fracture and increased mortality in osteoporotic patients. *J Bone Miner Res* 18, 1254–1260
- Johnell O, Kanis JA, Odén A, Sernbo I, Redlund-Johnell I, Pettersson C, De Laet C, Jönsson B (2004): Mortality after osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 15, 38–42
- Jussila A, Virta LJ, Kautiainen H, Rekiaro M, Nieminen U, Färkkilä MA (2012): Increasing incidence of inflammatory bowel diseases between 2000 and 2007: a nationwide register study in Finland. *Inflamm Bowel Dis* 18, 555–561
- Khor B, Gardet A, Xavier RJ (2011): Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307–317
- Kim JH, Jin HM, Kim K, Song I, Youn BU, Matsuo K, Kim N (2009): The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1. *J Immunol* 183, 1862–1870
- Kim K, Lee J, Kim JH, Jin HM, Zhou B, Lee SY, Kim N (2007): Protein inhibitor of activated STAT 3 modulates osteoclastogenesis by down-regulation of NFATc1 and osteoclast-associated receptor. *J Immunol* 178, 5588–5594
- Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T (2013): Immunological reaction in TNF- α -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol* 2013, 181849
- Kluge G, Borte M, Richter T, Kahn T, Borte G (2007): Osteodensitometrie bei Kindern und Jugendlichen mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung. *Rofo* 179, 58–64
- Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, et al. (2000): Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 191, 275–286
- Kurihara N, Chenu C, Miller M, Civin C, Roodman GD (1990): Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinology* 126, 2733–2741
- Lacey DL, Erdmann JM, Teitelbaum SL, Tan HL, Ohara J, Shioi A (1995): Interleukin 4, interferon-gamma, and prostaglandin E impact the osteoclastic cell-forming potential of murine bone marrow macrophages. *Endocrinology* 136, 2367–2376
- Lakomek H-J, Bokemeyer B, Lakomek M, Aydılek E, Siggelkow H (2012): Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Osteoporose. *Arthritis Rheuma Munch.* 32, 351–360
- Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL (2000): TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 106, 1481–1488
- Le Bourhis L, Benko S, Girardin SE (2007): Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem Soc Trans* 35, 1479–1484

- Lee JY, Lee YM, Kim MJ, Choi JY, Park EK, Kim SY, Lee SP, Yang JS, Kim DS (2006): Methylation of the mouse *Dlx5* and *Osx* gene promoters regulates cell type-specific gene expression. *Mol Cells* 22, 182–188
- Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack DV, Partridge NC (2007): Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J Biol Chem* 282, 33098–33106
- Lin GL, Hankenson KD (2011): Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 112, 3491–3501
- Liu H, Feng W, Yimin null, Cui J, Lv S, Hasegawa T, Sun B, Li J, Oda K, Amizuka N, Li M (2014): Histological Evidence of Increased Osteoclast Cell Number and Asymmetric Bone Resorption Activity in the Tibiae of Interleukin-6-Deficient Mice. *J Histochem Cytochem* 62, 556–564
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408
- Loftus EV (2004): Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126, 1504–1517
- Long F (2011): Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 27–38
- Lutter A-H, Hempel U, Wolf-Brandstetter C, Garbe AI, Goettsch C, Hofbauer LC, Jessberger R, Dieter P (2010): A novel resorption assay for osteoclast functionality based on an osteoblast-derived native extracellular matrix. *J Cell Biochem* 109, 1025–1032
- MACS® Cell Separation Miltenyi Biotec. <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/macs-cell-separation.html>; Zugriff am 18.11.2018
- Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115–137
- Marie PJ (1999): Cellular and molecular alterations of osteoblasts in human disorders of bone formation. *Histol Histopathol* 14, 525–538
- Martin TJ (2013): Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG. *World J Orthop* 4, 186–197
- McHugh KP, Hodivala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Lam J, Novack D, Feng X, Ross FP, Hynes RO, Teitelbaum SL (2000): Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest* 105, 433–440
- Menck K, Behme D, Pantke M, Reiling N, Binder C, Pukrop T, Klemm F (2014): Isolation of human monocytes by double gradient centrifugation and their differentiation to macrophages in teflon-coated cell culture bags. *J Vis Exp* 91 e51554
- Mikami Y, Yazawa K, Fukushima K, Arai T, Udagawa S, Samson RA (1989): Paecilotoxin production in clinical or terrestrial isolates of *Paecilomyces lilacinus* strains. *Mycopathologia* 108, 195–199
- Mikkola HKA, Orkin SH (2005): Gene targeting and transgenic strategies for the analysis of hematopoietic development in the mouse. *Methods Mol Med* 105, 3–22

- Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS (1989): Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc* 3, 953–960; discussion 960-961
- Miznerova E, Hlavaty T, Koller T, Toth J, Holociova K, Huorka M, Killinger Z, Payer J (2013): The prevalence and risk factors for osteoporosis in patients with inflammatory bowel disease. *Bratisl Lek Listy* 114, 439–445
- Mori T, Miyamoto T, Yoshida H, Asakawa M, Kawasumi M, Kobayashi T, Morioka H, Chiba K, Toyama Y, Yoshimura A (2011): IL-1 β and TNF α -initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. *Int Immunol* 23, 701–712
- Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Sturn DH, Wiedermann CJ (2004): Expression and function of RANK in human monocyte chemotaxis. *Arthritis Rheum* 50, 2309–2316
- Mullis KB (1990): The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262, 56–61, 64–65
- Nakamura H (2000): [Morphological study on cell-cell interaction between osteoclasts and osteoblasts]. *Kaibogaku Zasshi* 75, 427–432
- Nakamura H (2007): Morphology, Function, and Differentiation of Bone Cells. *J Hard Tissue Biol* 16, 15–22
- Nakamura I, Jimi E (2006): Regulation of osteoclast differentiation and function by interleukin-1. *Vitam Horm* 74, 357–370
- Nakao A, Fukushima H, Kajiya H, Ozeki S, Okabe K (2007): RANKL-stimulated TNF α production in osteoclast precursor cells promotes osteoclastogenesis by modulating RANK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 945–950
- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, et al. (2011): Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17, 1231–1234
- Neumann E, Schett G (2007): Knochenstoffwechsel. *Z Rheumatol* 66, 286–289
- Neumann E, Müller-Ladner U, Frommer KW (2014): Entzündung und Knochenmetabolismus. *Z Rheumatol* 73, 342–348
- Neve A, Corrado A, Cantatore FP (2012): Osteocytes: central conductors of bone biology in normal and pathological conditions. *Acta Physiol (Oxf)* 204, 317–330
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, et al. (2001): A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606
- Olivera P, Danese S, Peyrin-Biroulet L (2017): JAK inhibition in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol* 13, 693–703
- O'Neill L (2000): The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans* 28, 557–563

- Penny J, Harris P, Shakesheff KM, Mobasher A (2012): The biology of equine mesenchymal stem cells: phenotypic characterization, cell surface markers and multilineage differentiation. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17, 892–908
- Raggatt LJ, Partridge NC (2010): Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 285, 25103–25108
- Robling AG, Hinant FM, Burr DB, Turner CH (2002): Improved bone structure and strength after long-term mechanical loading is greatest if loading is separated into short bouts. *J Bone Miner Res* 17, 1545–1554
- Rocheffort GY, Pallu S, Benhamou CL (2010): Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 21, 1457–1469
- Rosario M, French JL, Dirks NL, Sankoh S, Parikh A, Yang H, Danese S, Colombel J-F, Smyth M, Sandborn WJ, et al. (2017): Exposure-efficacy Relationships for Vedolizumab Induction Therapy in Patients with Ulcerative Colitis or Crohn's Disease. *J Crohns Colitis* 11, 921–929
- Roux S, Brown J (2009): Osteoclast Apoptosis in Rheumatic Diseases Characterized by a High Level of Bone Resorption (Osteoporosis, Rheumatoid Arthritis, Myeloma and Paget's Disease of Bone). *Curr Rheumatol Rev* 5, 98–110
- Rufo A, Del Fattore A, Capulli M, Carvello F, De Pasquale L, Ferrari S, Pierroz D, Morandi L, De Simone M, Rucci N, et al. (2011): Mechanisms inducing low bone density in Duchenne muscular dystrophy in mice and humans. *J Bone Miner Res* 26, 1891–1903
- Sartor RB (2006): Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3, 390–407
- Schulte CMS (2004): Review article: bone disease in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 20 Suppl 4, 43–49
- Schwartz I, Seger D, Shaltiel S (1999): Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 539–544
- Shafique S: Polymerase Chain Reaction. Lap Lambert Academic Publishing, Riga 2012
- Siggelkow H, Eidner T, Lehmann G, Viereck V, Raddatz D, Munzel U, Hein G, Hüfner M (2003): Cytokines, osteoprotegerin, and RANKL in vitro and histomorphometric indices of bone turnover in patients with different bone diseases. *J Bone Miner Res* 18, 529–538
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, et al. (1997): Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309–319
- Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N (1995): Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 17, 87S-91S
- Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, Boyde A, Suda T (1988): Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* 122, 1373–1382
- Takahashi N, Udagawa N, Akatsu T, Tanaka H, Shionome M, Suda T (1991): Role of colony-stimulating factors in osteoclast development. *J Bone Miner Res* 6, 977–985

- Takeshita S, Kaji K, Kudo A (2000): Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res* 15, 1477–1488
- Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, Kurokawa T, Suda T (1993): Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 91, 257–263
- Turner CH (2006): Bone strength: current concepts. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 429–446
- Van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Löwik CWGM (2004): Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 199, 805–814
- Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM (2000): The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113, 377–381
- Von Scheven E, Corbin KJ, Stagi S, Stefano S, Cimaz R (2014): Glucocorticoid-associated osteoporosis in chronic inflammatory diseases: epidemiology, mechanisms, diagnosis, and treatment. *Curr Osteoporos Rep* 12, 289–299
- Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Vanden-Bossche A, Laroche N, Aubin JE, Vico L, Lafage-Proust M-H, Malaval L (2012): Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs primary bone formation and resorption: the marrow ablation model under PTH challenge. *Bone* 50, 1064–1073
- Warren JT, Zou W, Decker CE, Rohatgi N, Nelson CA, Fremont DH, Teitelbaum SL (2015): Correlating RANK ligand/RANK binding kinetics with osteoclast formation and function. *J Cell Biochem* 116, 2476–2483
- Wong G, Cohn DV (1974): Separation of parathyroid hormone and calcitonin-sensitive cells from non-responsive bone cells. *Nature* 252, 713–715
- Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MPG (2007): Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* 41, 928–936
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, et al. (1998): Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3597–3602
- Zhang Z, Welte T, Troiano N, Maher SE, Fu X-Y, Bothwell ALM (2005): Osteoporosis with increased osteoclastogenesis in hematopoietic cell-specific STAT3-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 800–807

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Durchführung und Verfassung meiner Arbeit unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Heide Siggelkow für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie für jegliche Unterstützung, die sie mir sowohl während der experimentellen als auch der Verschriftlichungsphase mit guten Ideen und konstruktiver Kritik gab.

Des Weiteren danke ich vor allem Regine Koepp, die mich in die praktische wissenschaftliche Arbeit mit viel Geduld und guten Tipps eingeführt hat und in dieser Arbeit die Versuche 2.2.4, 2.2.5, 2.2.6 und 2.2.19 durchgeführt hat. Ich danke außerdem Dr. rer. nat. Martina Blaschke für die zahlreichen konstruktiven Kritiken und die Unterstützung während der Verfassungsphase.